台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.62 No.3 2013

Research Articles

195 Drought Tolerant Rice Lines by Screening an 'IR64' Mutant Stock
Yong-Pei Wu

209 Intraspecific Competition among Same-aged Larvae and Adults of *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) in Field Bean Primary Leaves: Effects on Colony Production
Ching-Chin Chien, Hsiu-Chih Ku, and Shu-Chen Chang

225 Pathogen Characterization and Fungicide Screening of Stem Canker of Pitaya
Hui-Fang Ni, Chiao-Wen Huang, Sui-Li Hsu, Su-Yu Lai, and Hong-Ren Yang

235 Development of Japonica Rice Cultivar 'Tainung77'
Charng-Pei Li, Hsing-Mu Yen, Woei-Shyuan Jwo, Dung-Hung Wu, Ching-Shan Tseng, Tung-Hi Tseng, and Ming-Hsing Lai

249 Effects of Roasting Prior to Pressing on the Camellia Oil Quality
Ching-Ming Hsieh, Jeng-Chuann Yang, Yao-Chun Chuang, Eugene I-Chen Wang, and Ya-Lin Lee

259 Effect of Buffer Zones on Pollen-Mediated Gene Flow of Transgenic Rice
Ching-Shan Tseng, Yann-Rong Lin, Cheng-Ping Kuan, Ming-Hsing Lai, and Min-Tze Wu

268 Serological Reagent Preparation and Improvement of Serological Method for the Detection of *Plantago asiatica mosaic virus* in Lily
Chin-Chih Chen, Yu-Ling Jhang, Bi-Yun Lin, Fen-Lang Chiang, Ying-Huey Cheng, and Ting-Chin Deng

280 Polyploidy Hairy Roots Induction of *Salvia miltiorrhiza*
Chi-Ni Hsia, Uei-Chern Chen, Chin-Yi Tsao, Choi-Yi Lee, and Tzu-Ying Wu

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

ISSN 0022-4847

台灣農業研究 JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH Vol.62 No.3 2013

ISSN 0022-4847
DOI:10.6156/JTAR

台灣農業研究

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol.62 No.3 2013

研究報告

195 利用 'IR64' 突變庫篩選耐旱水稻之研究
吳永培

209 非洲菊斑潛蠅繁殖時同齡幼蟲與成蟲在菜豆本葉上之種內競爭
錢景秦、古琇芷、張淑貞

225 紅龍果莖潰瘍病之病原特性及防治藥劑篩選
倪蕙芳、黃巧雯、許淑麗、賴素玉、楊宏仁

235 稉稻新品種 '台農 77 號' 之育成
李長沛、顏信沐、卓緯玄、吳東鴻、曾清山、曾東海、賴明信

249 茶籽榨油前炒培處理對油品之影響
謝靜敏、楊正釧、莊曜駿、王益真、李雅琳

259 緩衝區設置對基因轉殖水稻花粉媒介基因流佈之影響
曾清山、林彥蓉、關政平、賴明信、吳明哲

268 百合 *Plantago asiatica mosaic virus* 檢測試劑製備與提升病毒檢出率之血清檢定法研發
陳金枝、張郁靈、林碧雲、江芬蘭、鄭櫻慧、鄧汀欽

280 丹參多倍體毛狀根誘導研究
夏奇鈮、陳威臣、曹進義、李秋儀、吳姿穎

行政院農業委員會農業試驗所出版

《台灣農業研究》編審會

總編輯

楊純明／農業試驗所

領域主編（按筆劃序）

王強生／中興大學農藝系
申　雍／中興大學土壤環境科學系
安寶貞／農業試驗所植物病理組
呂秀英／農業試驗所
柯文雄／中興大學植物病理學系
侯豐男／中興大學昆蟲學系
郭鴻裕／農業試驗所農業化學組
高景輝／臺灣大學農藝學系
陳世銘／臺灣大學生物產業機電工程系
陳吉仲／中興大學應用經濟系
陳宗禮／中興大學農藝系
陳健忠／農業試驗所應用動物組
陳琦玲／農業試驗所農業化學組
陳福旗／屏東科技大學農園生產系
黃肇家／農業試驗所作物組
黃鵬林／臺灣大學園藝暨景觀學系
鄔宏潘／中央研究院植物暨微生物學研究所
曾夢蛟／中興大學園藝系
蔡致榮／農業試驗所
蔡新聲／朝陽科技大學生化科技研究所
歐錫坤／農業試驗所作物組
簡立賢／中興大學應用經濟系
蘇正德／東海大學食品科學系

編輯助理

吳宜晏／農業試驗所技術服務組
陳相君／農業試驗所研策小組

台灣農業研究

第六十二卷　第三期　　中華民國一〇二年九月三十日

出版者　行政院農業委員會農業試驗所
發行人　陳駿季
總編輯　楊純明
地址　41362 台中市霧峰區萬豐里中正路 189 號
網址　http://www.tari.gov.tw
電話　(04)2331-7236
E-mail　jtar@tari.gov.tw
線上投審稿系統　http://aspers.airiti.com/Aspers/webHome.aspx?jnliid=J0042

編印　Airiti Press Inc.
地址　23452 新北市永和區成功路一段 80 號 18 樓
電話　(02)2926-6006
E-mail　press@airiti.com

定價　新臺幣一七五元
展售門市
1. 國家書店 / 10485 台北市松江路 209 號 1 樓 / 電話 : (02) 2518-0207
   國家網路書店 http://www.govbooks.com.tw
2. 五南文化廣場 / 40042 台中市中山路 6 號 / 電話 : (04) 2226-0330

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 62(3):195–208 (2013)
DOI: 10.6156/JTAR/2013.06203.01

利用 'IR64' 突變庫篩選耐旱水稻之研究

吳永培 [1,*]

摘要

吳永培。2013。利用 'IR64' 突變庫篩選耐旱水稻之研究。台灣農業研究 62(3): 195–208。

本研究利用經二次疊氮化鈉突變誘發所培育之 'IR64' 誘變庫為材料，於水稻幼苗期利用 28% PEG 6000 模擬缺水逆境之水耕液栽培方式，由 2,500 個突變體迅速篩選出 152 個耐旱突變品系，其後再利用水旱田栽培方式進行突變品系成株期耐旱性之評估，試驗結果顯示有 58.7% 之突變品系其產量耐旱指數 (水田產量/旱田產量百分比) 表現較佳，具有耐缺水逆境之潛力；進一步以 9 個突變品系進行成株期耐旱性的評估，結果發現各突變品系在產量與耐旱等級之表現趨勢一致，並以 SM47 及 SM100 兩突變品系的耐旱特性表現最佳。由試驗結果可知水稻耐旱育種之操作可在幼苗期先透過 PEG 6000 進行缺水耐受性的篩選，其後再透過產量耐旱指數進行篩選，如此便可快速選育出適合台灣栽培利用之耐旱水稻新品種。

關鍵詞：突變品系、耐旱、水稻。

前言

利用誘變方式可創造及產生變異，藉此途徑找到耐逆境材料而解決台灣耐逆境種原缺乏的困境，故其是台灣發展耐逆境水稻育種的重要關鍵因素，而國內水稻利用化學誘變劑進行誘變研究諸如疊氮化鈉 (sodium azide; SA) 和 ethyl methane sulphonate (EMS) 已有不錯的成效，農委會農業試驗所利用疊氮化鈉誘變法產生 3,000 個台農 67 號突變品系，其中包括米粒顏色、米粒外觀、蛋白質含量及組成、脂肪酸、食味、直鏈澱粉、抗病蟲性、農藝特性等多種具有實用或學術研究價值的突變系 (Chern & Huang 1984; Wang *et al*. 2002; Chou 2004)。而 Wu & Lur (2002) 亦利用疊氮化鈉、EMS 及 N-methyl-N-nitrosourea (NMU) 等三種化學誘變劑誘變 '台農 67 號'、'台農 72 號'、'台稉 8 號' 及 '台稉 9 號' 等國內栽培品種，結果亦得到相當多品質及營養特性上有高度利用價值的突變體 (Liao 2012)，具有發展新特性的潛力。Wu *et al*. (2007) 更以 EMS 誘變嘉農育 911303 號，並從突變後代中篩選出強香、中香、微香及無香等 4 種不同香味程度的品系，且由米粒品質的檢定中發現後代突變品系之蛋白質、脂肪酸含量及食味值有大量變異性存在，顯示利用化學誘變可擴大目前栽培稻的香味類型，增加香味種類及強度。而國外學者研究報告亦指出，可利用化學誘變劑 NMU 誘發稻米品質特性之突變，諸如蛋白質、貯藏性蛋白質、胺基酸、心白、大胚、粉狀質、澱粉特性、糯性、半糯性 (Kikuchi 1994)、高直鏈澱粉 (Satoh & Omura 1981; Okuno *et al*. 1983) 等，顯示利用誘變方式改變水稻品質特性是十分可行的途徑。

水稻是亞洲 30 億人口主要的食物，亞洲人民消費了 90% 世界生產的稻米 (Li & Xu 2007)。現今水稻總生產面積達 154,000,000 ha，且超過 45% 水稻栽培於多雨地區，因此若面臨灌溉水分匱乏，其會發生乾旱並對產量造成嚴重的影響 (IRRI 2002)。而 95% 的亞洲低緯度地水稻產量均相當低，約 1.0–2.5 Mg ha^{-1}，主要是因爲雨量的不穩定及缺乏所造成。過去在缺水的栽培

投稿日期：2013 年 2 月 20 日；接受日期：2013 年 5 月 14 日。
[*] 通訊作者：wuypei@dns.caes.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所嘉義試驗分所農藝系副研究員。台灣 嘉義市。

環境下，對於水稻耐旱性遺傳改良的進展相當有限且緩慢 (Evenson & Gollin 2003)。其原因主要是對耐旱特性的遺傳行爲了解相當少，尤其是缺乏有效的篩選技術來挑選耐旱雜交後代 (Khush 2001)，因此有學者建議以植株耐旱性狀，諸如根部性狀、生理活性等作爲評價耐旱性良劣之指標 (Nguyen *et al*. 1997; Bernier *et al*. 2008; Kamoshita *et al*. 2008)。水資源是一不易改變的自然狀況，因此選育對乾旱具抗性或耐受性之高產水稻品種，乃成爲水資源有限且日益缺水環境下改進稻作生產的主要手段，亦是水稻育種者未來所面臨的重大挑戰 (Zhao *et al*. 2008)。

水分缺乏會改變作物之外表型表現及農藝特性，降低作物之產量，影響程度依乾旱時間點及發生時期長短而定 (Jongdee *et al*. 2002)。基本上乾旱影響水稻生產有三個模式，即早期、間歇性及後期乾旱逆境 (Fukai & Cooper 1995)。早期乾旱經常導致耕作或移植延遲，發生於營養生長最高分蘗期之早期乾旱對稻穀生產的影響較小，一般會導致分蘗數減少 (Boonjung & Fukai 1996; Jongdee *et al*. 2006)；在分蘗期至開花期間若發生間歇性或連續性乾旱，則外表型可能並未表現明顯出現之乾旱特徵，如葉片捲曲，但會導致產量大幅降低。其原因主要是葉片伸展及光合作用受到抑制而導致減產 (Fukai & Cooper 1995)。當乾旱於生長後期發生時，即於幼穗形成及開花期時，小穗稔實率降低是造成產量損失的主要因素 (Liu *et al*. 2006)。因此，不同的乾旱模式對作物會有不同的影響，故於育種前，育種家當對不同生育期之水稻耐旱性進行評估，即選定育成抗何種乾旱模式的水稻品種是相當重要的考量。因爲它將會決定及影響抗旱水稻育種策略及操作的擬定 (Fukai & Cooper 1995)。

水稻在中度水分缺乏期間，由於水稻根系小，快速氣孔關閉及葉片老化等，使得水稻成爲對乾旱反應相當敏感的作物之一 (Hirasawa 1999)。就像其它作物一樣，水稻具有育成抗乾旱逆境作物的潛力，可由三個不同的策略來進行，即逃旱性 (drought escape)、避旱性 (drought avoidance)、耐旱型 (drought tolerance) 等三種。調整栽培期讓水稻對乾旱逆境最敏感的時期能有充足水分供給，是逃旱性的主要策略 (Price *et al*. 2002)；利用深根系特性能進入深層土壤中吸取水分，或在不影響產量的情形下降低蒸散作用，是避旱性的有效策略 (Price *et al*. 2002)；而水稻在土壤水分潛勢降低的情形下，可利用調整滲透潛勢 (osmotic adjustment; OA) 的機制，維持細胞膨壓則爲耐旱性 (Price *et al*. 2002)。避旱性的機制即使在非水份逆境下仍會運作表現，是一種構造性的機制，而耐旱性則是受乾旱逆境誘導後開啓保護反應的一種結果 (Hazen *et al*. 2005)，因此是發展水稻乾旱逆境抗性的最合適策略。一般乾旱逆境若是短暫且可預期時，利用逃旱性種植早熟性品種，由當中選育高產潛能的品種是較好的策略，而當乾旱發生的時期及長短是無法掌握預期時，避旱型及耐旱型的水稻種植及選育則爲必需且合適的運用策略 (Pantuwan *et al*. 2002)。

到目前爲止，水稻育種計畫於乾旱抗性的進展仍十分有限 (Fukai & Cooper 1995)，其主要歸因於抗旱特性受到許多不同效應的基因控制，且乾旱發生的時間點及嚴重程度不同，更影響抗旱性評估之穩定性的表現。也更顯示乾旱抗性的複雜度，諸如逆境下控制產量的有關基因，其基因與基因、基因與環境間之交感效應，均會使得抗旱育種的困難度大幅提升 (Price *et al*. 2002)。另外最大的原因則在於對耐旱水稻種原之篩選上投入不足 (O’Toole 2004)。很少研究計畫將耐旱種原的篩選列爲育種中例行性的工作項目，因此雖然在遺傳與生理上的分析已進行相關研究，但不同來源之耐旱種原仍相當有限。大部陸稻生長栽培環境，其乾旱的發生均是無法預期的，且因乾旱並非每年均會發生，致使農民不願犧牲現已種植之最高產量潛能水稻品種，轉而栽培乾旱逆境下有較高產量維持之水稻品種。育種家因此必須找尋在非逆境與逆境下均能表現出高產之水稻品種，因此育種家過去十年來致力於 3 個主要目標之開發 (Rosielle & Hamblin 1981)：(1) 增加高產潛能；(2) 選育水稻開花期剛好能有足夠水分供應的新品種；(3) 改良乾旱抗

性 (Mackill *et al*. 2003)。而產量潛能的評估在非逆境與逆境下具正相關關係 (Bernier *et al*. 2007; Atlin *et al*. 2004; Venuprasad *et al*. 2007)。Atlin *et al*. (2004) 證實即使非逆境較逆境下平均產量高 50%，其在未經選拔之不同族群重組自交系中不同基因型間，在兩種環境下之產量表現仍維持正相關關係，因此可在中度乾旱環境下藉由產量潛能選拔出產量表現優良之品種 (Atlin *et al*. 2004)。而當水分逆境發生的時期是可預測時，選拔水分逆境發生前，水稻便能完成開花之基因型是相當可行的策略，這在水分逆境發生於水稻栽培末期之地區，如印度東部、泰國和洛杉機等是可行的方式。至於水分逆境的發生若無法預測時，則以選育耐旱性品種爲主要考量。台灣地區水分逆境的發生，基本上偏向於無法預測，且由於暖化趨勢過去百年間升溫約 1.0–1.4℃，是全球平均值的 2–2.5 倍，受環境逆境影響可謂相當大，而台灣主要栽培的糧食作物爲水稻，故應積極投入對環境等非生物性逆境水稻之研發，以利台灣農業因應暖化時代的來臨。

材料與方法

材料

以 'IR64' 經疊氮化鈉 2 次誘變庫爲材料，其第 1 次誘變以 2 mM 之疊氮化鈉溶液進行誘變後，M_1 世代單本種植於田間約 3,000 株，成熟自交後單株收穫，每 1 單株取 2 粒進混合培育成爲 M_2 族群並種植於田間，同樣單株收穫後再取 2 粒混合進行第 2 次誘變，第 2 次則以 1.5 mM 之疊氮化鈉溶液進行誘變，依第 1 次誘變的操作方式，於第 2 次誘變操作時單株收穫 M_2 稻株約 2,500 株，每 1 單株取 2 粒種子分別進行幼苗期之缺水耐受特性篩選。

耐旱特性之篩選

'IR64' 突變庫耐旱特性之篩選：本試驗使用之 'IR64' M_3 種子先以稀釋 1,000 倍的免賴得粉劑進行種子消毒，其後置於發芽皿中以 30℃進行催芽並每日換水，待參試種子皆萌芽後即點播於 80 孔之水耕盤上進行水耕方式栽培，搭配塑膠水槽及水耕盤置於溫室中培養水稻幼苗。本試驗使用改良木村式 B 式水耕配方 (Yoshida *et al*. 1976)，種子點播入水耕盤後即使用 0.5 倍水耕液培養幼苗，待材料生長至 1 葉齡後更換爲 1 倍水耕液，3 葉齡時則更換爲 1.5 倍水耕液培養。待約 14 d 後幼苗平均達 3–4 葉齡時將培養之水耕液更換爲含 20% 聚乙二醇 (PEG 6000) 之 1.5 倍水耕液，從而進行水稻幼苗期模擬缺水處理試驗，缺水處理 3 d 後，反復沖洗稻根數次後，水耕盤中加入自來水並培育 1 d 後，再加入 0.5 倍水耕液培育 7 d，其後將存活之 M_3 秧苗以單本植方式移植於田間，令其自交且單株收穫自交之 M_4 種子供缺水耐受特性之再確認利用。

突變體秧苗期缺水耐受特性之再確認：'IR64' 突變庫經秧苗期缺水耐受性篩選所得到之 152 株 M_3 耐旱株，經移植田間培育最後存活之 126 株之 M_3 植株，分別收穫自交單株之 M_4 種子，即成立爲 126 個 M_4 品系，126 個誘變品系分別再經 28% 之 PEG 6000 缺水耐受性處理，每品系 2 重複，並於缺水耐受性處理後每天調查水稻幼苗乾旱等級表現，調查標準採用國際水稻研究所訂定之水稻乾旱分級標準 (Standard Evaluation System; IRRI 1996)，依照水稻幼苗葉片捲曲及乾枯程度進行 0、1、3、5、7 及 9 等不同等級之鑑別，以區別幼苗間耐旱能力 (圖 1)，缺水處理之復水標準則評估缺水敏感型對照品種 'IR64' 之耐旱等級表現，當 'IR64' 幼苗之耐旱等級平均達 7 級，即爲本試驗之恢復水耕液正常培育之時期。

耐旱 M_4 突變系水旱田間實用性之評估：利用篩選之 126 個 M_4 世代之耐旱突變品系爲材料，100 年二期作將材料分別種植於水旱田試驗區，其中旱田區在每叢分蘗數目平均達到 12 穗時，即進行 24 d 之乾旱斷水處理，其後再進行一次水深 5 cm 的人工灌水，直至收穫時均不再進行人工灌水，由於斷水處理開始至收穫期過程中並未出現自然降雨情形，因此不會影響斷水乾旱處理之效果，故在水田及旱田試驗之灌漑水供給均採用人工給水方式進行。水旱田區之突變品系種植以每系 3 行植，每行 8 株，不設重複，採用順序排列進行，每 30 突變品系即種植 'IR64' 做爲產量校正用對照品

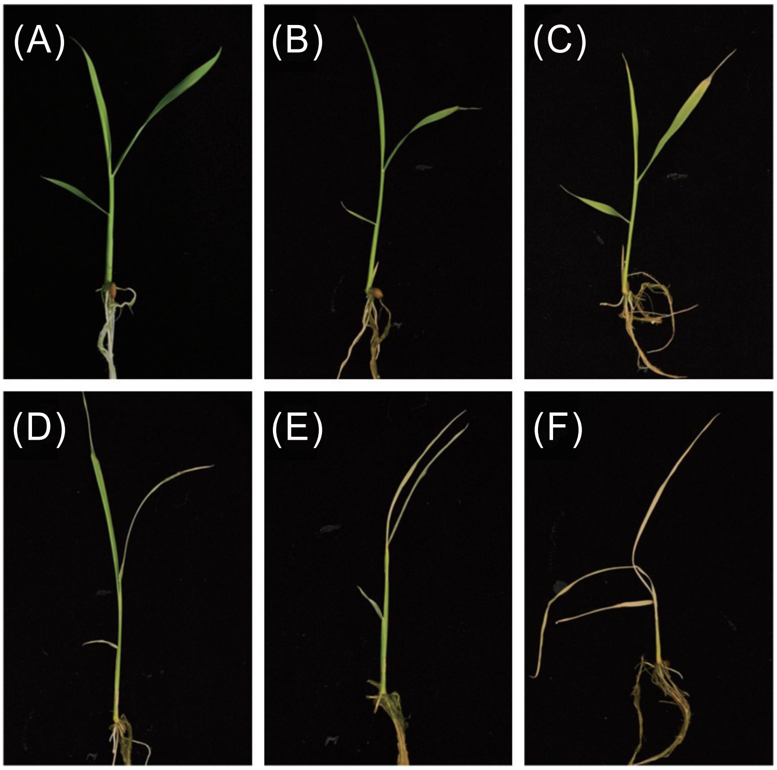

圖 1. 水稻幼苗耐旱等級之型態。(A)–(F) 爲水稻三葉齡幼苗進行耐旱處理後，不同耐旱表現之等級，分別爲 0 (未乾旱處理)、1 (極抗旱)、3 (抗旱)、5 (耐旱)、7 (敏感不耐旱)、9 (極敏感不耐旱)。

Fig. 1. The different scales of rice morphology in response to drought treatment. (A)–(F) Rice was treated with drought during 3-leaf seedling and scaled as 0 (no drought treatment), 1 (high resistance), 3 (resistance), 5 (tolerance), 7 (sensitivity), and 9 (high sensitivity), respectively.

種，而當各突變品系達成熟期時，每品系混合收穫中間行 10 叢稻株調查稻穀產量，並利用 ‘IR64’ 之稻穀產量做爲校正基礎，換算產量百分比率。

幼苗期具高耐旱性之突變品系之成株期耐旱特性評估：利用突變體秧苗期缺水耐受性再確認之結果爲基礎，挑選幼苗期耐旱等級表現 3 級之 SM13、SM36、SM47、SM66、SM72、SM100、SM103、SM117、SM130 等 9 個突變系 (M_5 世代) 爲材料，並以敏感型之 ‘IR64’ 爲對照品種，將所有材料種植於 12 m × 5 m 長之水泥槽中，水泥槽於加水攪拌成泥漿並待泥漿沉澱後，採用 RCBD 試驗設計種植所有品系，3 重複，每品系種植 1 行植，每行 25 株秧苗，行株距爲 0.25 m × 0.20 m。於分蘖數平均達到 12 個分蘖時，乃開始停止供給水分，並於參試材料葉片開始發生捲曲時後，即開始進行耐旱傷害等級調查，直至各參試材料出現明顯之耐旱等級差異爲止，而於對照 ‘IR64’ 葉片達到感極 7 級時，開始恢復灌水，此時期爲 ‘IR64’ 開始準備開花抽穗時期。

高級產量試驗： SM13、SM47、SM72、SM100、SM103 和 SM117 等 7 個突變系之 M_4 突變系於單株收穫後，其穀粒供進行一年二期作之高級產量試驗 (M_5 及 M_6 世代)，試驗於 2012 年一及二期作進行，並以 ‘IR64’ 做爲參試之對照品種，試驗採用 RCBD 設計，每一品系 4 行植，每行 25 株，行株距爲 0.30 m × 0.15 m，4 重複，於成熟時收穫並調查各品系之株高、穗長、穗重、穗數、一穗穎花數、稔實率、千粒重及小區稻穀產量。

本試驗所有材料之培育及種植均於農業試驗所嘉義分所水稻試驗田區進行，其田間管理按一般慣行法栽培。

結果

'IR64' 突變庫耐旱特性之篩選

利用 2,500 株經 2 次疊氮化鈉誘變 'IR64' 之 M_3 種子爲材料，於水稻秧苗達 3 葉齡時，即進行 20% 之 PEG 6000 缺水逆境處理，結果如圖 2 所示，在 2,500 株之幼苗中，結果發現有 152 株呈現 3–5 級之抗 (耐) 旱性反應，佔總誘變株比率爲 6.08%，顯示利用疊氮化鈉處理確實已誘變 'IR64' 產生變異，而移植這些存活 M_3 植株於田間培植，結果僅 126 株可正常成長並收穫得到 M_4 世代種子，此 126 株 M3 植株乃單株收穫分別成立 M_4 突變品系。

爲了確認 126 個獲選突變品系 (M_4) 之缺水耐受性，模擬缺水逆境處理改採 28% PEG 6000 進行處理，經調查各突變品系 2 重複的試驗結果，挑出突變品系之抗旱等級在 2 重複均達 3 級者，結果發現 SM13、SM36、SM47、SM72、SM100、SM103、SM117、SM130 等 9 個突變品系 (M_5 世代) 其2重複均出現3級抗性反應，此即爲獲選之幼苗期優良高耐旱性突變品系。

M_4 突變系水旱田稻穀產量之評估

以幼苗期經 20% PEG 6000 缺水逆境處理獲選之 126 個 'IR64' M_4 突變系爲材料，於 2011 年 2 期利用水田及旱田栽培模式同時進行突變品系成株期稻穀產量調查，結果發現在水田栽培狀態下，以 'IR64' 稻穀產量爲 100% 之對照，126 個突變品系之產量指數介於 21–143% (圖 3)，其中有 21 個突變品系之稻穀產量高於對照品種 'IR64'，佔所有參試突變系比率 16.7%，而有 3 個突變品系稻穀產量與 'IR64' 相同，合計與 'IR64' 稻穀產量相同或高者有 24 個，佔所有耐旱突變系比率約 19%，顯示有相當比率之 M_4 突變品系，在水田栽培下不因爲突變品系增加缺水耐受性，致使其稻穀產量表現受到影響，尤其突變品系 SM7、SM28、SM30、SM31、SM34、SM35、SM47、SM55、SM65、SM68、SM77 等 11 個品系，其稻穀產量指數均高於 'IR64' 對照品種 10% 以上，顯示具有高產潛能，

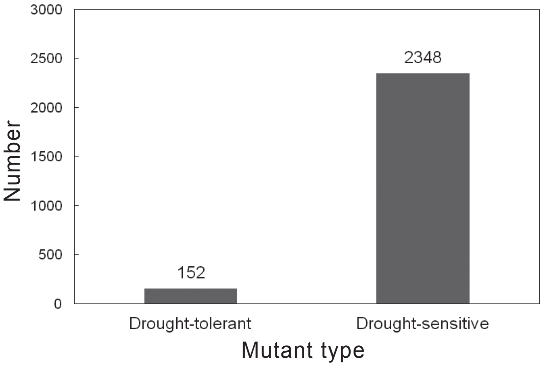

圖 2. 'IR64' 之 M_3 突變庫經 20% PEG 6000 缺水逆境處理之耐旱及敏感株數分布圖。

Fig. 2. The number of the drought-tolerant and sensitive mutants in the 'IR64' M_3 mutation stock after treatment with 20% of PEG 6000.

尤其 SM65 及 SM68 之稻穀產量指數分別爲 137% 及 143%，高產潛能十分優良；唯有 10 個突變品系稻穀產量指數僅達 'IR64' 約 50% 以下，顯示這 10 個品系之稻穀產量表現受到嚴重之影響。

在 126 個 M_4 突變品系利用旱田栽培之突變品系稻穀產量試驗中，結果發現在旱田栽培狀態下，以對照 'IR64' 之稻穀產量指數爲 100%，換算 126 個突變品系之稻穀產量指數則介於 8–122% (圖 4)，其中有 20 個突變品系之稻穀產量高於對照品種 'IR64'，占所有耐旱突變品系比率爲 15.9%，顯示有相當比率之突變品系於旱田栽培下，由於突變品系增加了耐旱特性，故其在導入旱田栽培的情況下，其稻穀產量指數有提升之效益。尤其突變品系 SM2、SM68、SM87、SM107 等 4 個品系，其稻穀產量指數均高於 'IR64' 對照品種 11% 以上，顯示具有高缺水耐受性及高產之潛能，尤其 SM2 之稻穀產量指數分別爲 122%，顯示高產潛能十分優良；唯亦有 7 個突變品系之稻穀產量指數僅達 'IR64' 約 50% 以下，顯示這 7 個品系稻穀產量之表現受到缺水逆境嚴重影響，此 7 個突變品系應不具有成株期的缺水耐受性。

水稻栽培過程中若孕穗期遭遇缺水逆境時，其稻穀產量會因稔實率等產量構要素受到缺水影響而降低，因此爲了解獲選突變品

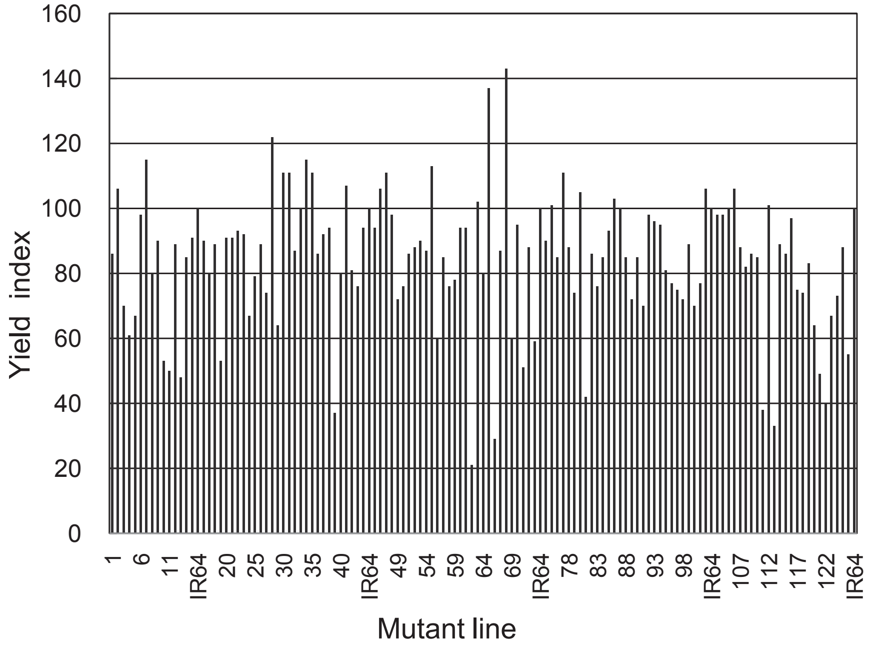

圖 3. 126 株 'IR64' 耐旱突變系水田產量指數分布圖。

Fig. 3. The grain yield indices of 126 'IR64' drought-tolerant mutant lines under irrigated cultivation.

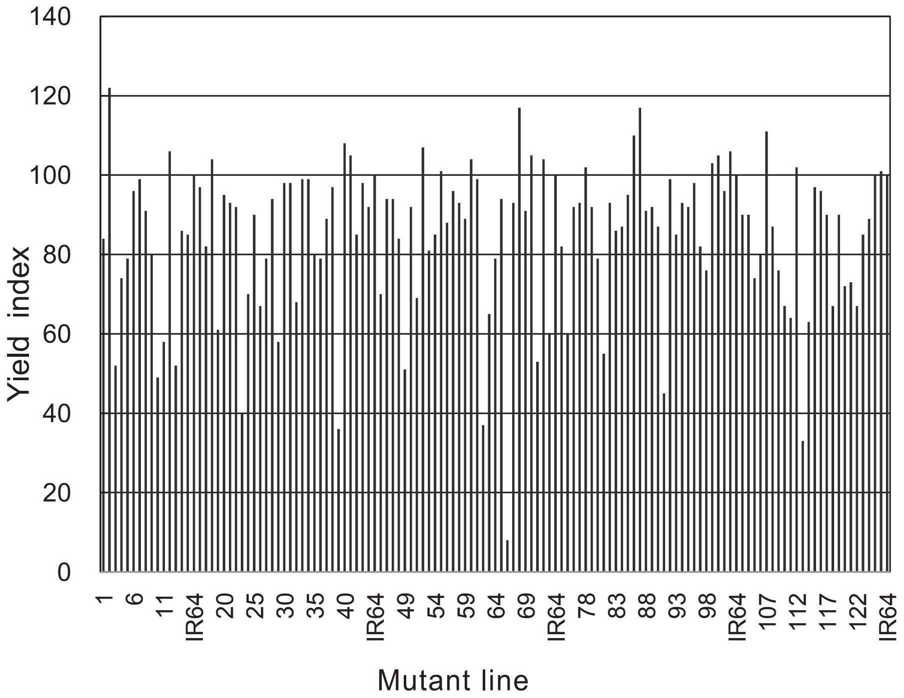

圖 4. 'IR64' 耐旱突變系旱田產量指數分布圖。

Fig. 4. The grain yield indices of 126 'IR64' drought-tolerant mutant lines under upland cultivation.

系 (秧苗期具耐旱性) 在成株期是否仍表現缺水耐受性，乃進一步以旱田與水田之稻穀產量之比值換算成百分比指數 (稻穀產量耐旱指數) 後。再探討突變品系在成株期之耐旱性程度，結果如圖 5 所示，其旱田與水田突變品系稻穀產量耐旱指數介於 31–198%，其中較具耐旱潛力且超過對照 'IR64' 者有 74 個突變品系，占所有參試品系比率爲 58.7%，尤其是 SM4、SM5、SM12、SM40、SM43、SM50、SM52、SM56、SM57、SM60、SM62、SM67、SM69、SM70、SM72、SM79、SM81、SM89、SM96、SM100、SM101、SM107、SM111、SM121、SM122、SM123、SM126 等稻穀產量之耐旱指數均高 120% 以上，爲耐旱性潛力較高之品系，其中 SM62、SM69、SM111、SM122、SM126 等 5 個突變品系之稻穀產量耐旱指數高於 150% 以上，耐旱特性十分值得進一步深入探討與利用。

至於突變品系在成株期之耐旱特性表現較敏感者，其稻穀產量之耐旱指數則介於 31–99%，其中較敏感且低於對照 'IR64' 者有 49 個突變品系，占所有參試品系數 38.9%，尤其是 SM3、SM23、SM26、SM28、SM32、SM35、SM49、SM51、SM63、SM65、SM66、SM75、SM80、SM91、SM105、SM106、SM、SM110、SM114 等，其旱田稻穀產量低於水田產量 20% 以上，尤其 SM23 及 SM66 旱田稻穀產量低於水田產量 50% 以上，顯示此 2 品系在成株期耐旱特性之潛力較差，是屬於敏感的突變品系。再者，進一步檢視對照品種 'IR64' 之 5 個小區之稻穀產量，其耐旱指數表現介於 99–113% 左右，平均爲 103%，顯示本實驗在水旱田栽培之處理並未對 'IR64' 之稻穀產量造成影響，是否因乾旱處理的強度不足，仍有待進一步釐清後，才能更有效了解突變品系在成株期耐旱特性之表現，唯由 'IR64' 的水田及旱田栽培下之生長反應，似顯示 'IR64' 生長旺盛，因此在遭逢缺水逆境時，其耐受性表現不錯，因此 'IR64' 可能是幼苗期對缺水逆境較敏感之品種而已，未來進行

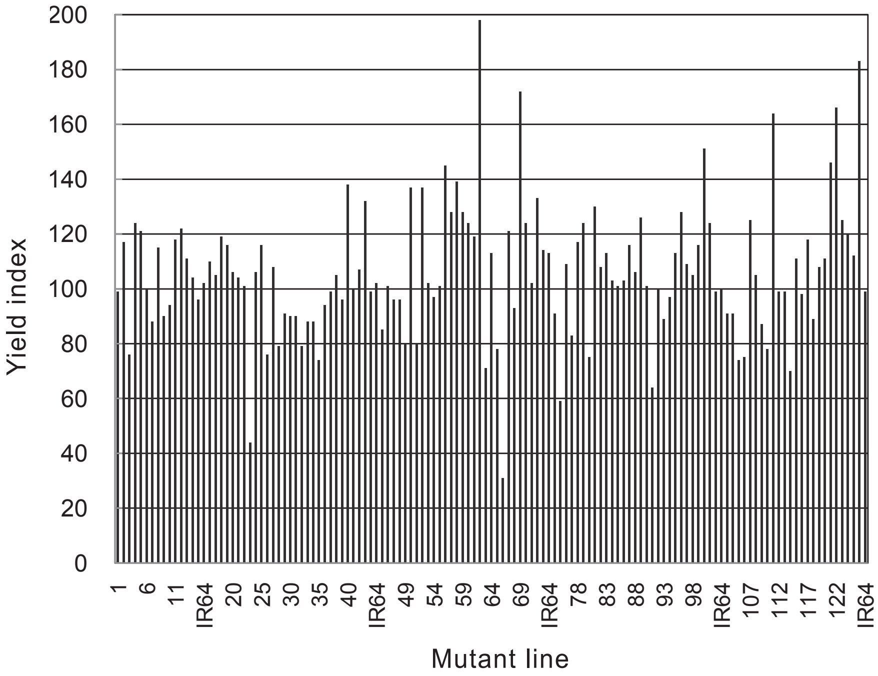

圖 5. 'IR64' 耐旱突變系旱田和水田稻穀產量比率分布圖。

Fig. 5. The grain yield indices of 126 'IR64' drought-tolerant mutant lines under upland and irrigated cultivation.

田間耐旱性稻穀產量評估時，宜利用本次試驗中表現較為敏感之突變品系做為對照品種。

幼苗期具高耐旱性之突變品系成株期耐旱特性之表現

利用幼苗期耐旱等級表現出 3 級之 SM13、SM36、SM47、SM66、SM72、SM100、SM103、SM117、SM130 等 9 個突變系 (M_5 世代) 為材料，並以敏感型之 ‘IR64’ 為對照品種，於水泥槽進行缺水逆境處理，減少因田間變異因素過多，造成耐旱性評估上的誤判。其試驗結果發現，在 9 個突變品系中 (表 1)，SM66 由於植株高度發生劇烈矮化現象，導致稻穀產量表現相當低，僅 352 kg ha^{-1}，其餘 8 個品系之稻穀產量則介於 3,410–6,358 kg ha^{-1}，對照品種 ‘IR64’ 之稻穀產量為 5,764 kg ha^{-1}，與 SM36、SM47、SM72、SM100、SM103、SM117 及 SM130 間並無顯著差異，唯其中以 SM47、SM72、SM117 等 3 個突變品系稻穀產量分別 6,248、6,248、6,538 kg ha^{-1}，由於稻穀產量已高於 6,000 kg ha^{-1}，顯示具有相當高產潛能，值得進一步探討利用。

9 個幼苗期呈現耐旱表現之突變品系，當進行斷水之缺水逆境處理，在土壤水分張力達 -50 kPa 時，即開始進行耐旱等級調查，當各參試品系之耐旱等級出現明顯差異，乃以各品系 2 重複之耐旱等級進行統計分析，結果如表 1 所示，各突變品系之耐旱等級介於 5.3–8.6 間，而對照品種 ‘IR64’ 之耐旱等級則為 6.0。其中 SM13、SM66 及 SM130 間之耐旱等級差異不顯著，是成株期對缺水逆境較為敏感者；而 SM47、SM36、SM72、SM100、SM103、SM117 等 6 個品系間耐旱等級亦差異不顯著，且與 ‘IR64’ 間無顯著差異存在，而在 9 個突變品系中，以 SM47 及 SM100 之耐旱等級 5.3 的表現值最低，是成株期對缺水逆境表現較具耐受性者。然 SM13 等 3 個較為敏感品系，則與較具缺水耐受性之 6 個品系間存在顯著性之差異。

表 1. 2011 年一期作 ‘IR64’ 和 9 個耐旱突變系產量試驗之稻穀產量表現。

Table 1. The grain yield of ‘IR64’ and 9 drought-tolerant mutant lines in yield trials at the first cropping season of 2011.

Line or variety	Grain yield (kg ha^{-1})	Scale of drought-tolerance
SM13	3,410 b[z]	7.7 a
SM36	5,632 ab	6.1 b
SM47	6,248 a	5.3 b
SM66	352 c	8.6 a
SM72	6,248 a	5.6 b
SM100	5,610 ab	5.3 b
SM103	5,368 ab	5.8 b
SM117	6,358 a	5.7 b
SM130	4,422 ab	7.7 a
‘IR64’	5,764 a	6.0 b

[z] Means with the same letter of a row are not significantly different at 5% level by LSD test.

高級產量試驗經變方分析發現，一期作所有參試材料在株高、穗數、稔實率、千粒重和小區產量等 5 個存在顯著差異，而穗長、穗重、一穗穎花數則無差異存在 (表 2)；至於二期作則穗數差異不顯著外，其餘 7 個特性在參試材料間均存在顯著性差異 (表 3)。而由產量試驗結果發現其中 SM100 及 SM117 之產量潛力表現最佳，並與對照品種 ‘IR64’ 間差異不顯著；而二期作則除 SM13 的小區產量表現最差外，其餘突變品系與對照品種 ‘IR64’ 間差異不顯著。

討論

‘IR64’ 突變庫經稻秧苗缺水逆境篩選，其結果顯示疊氮化鈉已誘發水稻耐旱性發生改變，尤其兩次之誘變處理可大幅提高耐旱突變率達 6.08%，與 Jwo (2007) 以疊氮化鈉 (NaN_3) 誘變水稻台農 67 號選育出耐鹽性及感鹽性突變品系，Yen (2011) 由 EMS 誘變系中篩選出 11 個耐鹽品系，並發現 SM75 與 SM61 兩品系耐鹽性表現較 Pokkali 和 Nona Bokra 優良等結果相似。尤其 Kuo (2012) 利用 5 個 EMS 耐鹽性突變品系為材料，探討 200 mM 之氯化鈉溶液逆境處理下，不同突變系之耐鹽基因遺傳控制機制，結果發現突變品系 SM61 及 SM75 之耐鹽性為一對顯性基因控制之遺傳模式，突變品系 SM77 及 SM143 之耐鹽性為一對或二

表 2. 2012 年一期作 'IR64' 和 7 個耐旱突變品系水田栽培下高級產量試驗之表現。

Table 2. Performance of 'IR64' and seven drought-tolerant mutant lines in the advanced yield trials under irrigated culture at the first cropping season of 2012.

Line or variety	Plant height (cm)	Panicle length (cm)	Panicle weight (g)	Panicle number (No.)	Spiketlet/ panicle (No.)	Seed set (%)	1000-grain weight (g)	Grain yield (kg ha^{-1})
SM13	92.98 e[z]	24.04	2.13	21.28 a	92.28	84.75 b	24.41 c	7,386 bc
SM36	94.70 d	23.25	2.44	17.98 b	93.63	91.32 a	27.05 a	7,042 c
SM47	98.65 c	23.10	2.12	18.18 b	83.98	91.85 a	26.31 ab	7,847 bc
SM72	105.30 a	23.90	2.30	17.23 b	89.60	84.25 b	27.44 a	8,018 bc
SM100	99.65 c	23.68	2.29	19.23 ab	88.68	91.53 a	26.29 ab	8,630 ab
SM103	99.55 c	23.42	2.14	17.50 b	79.80	90.58 a	28.03 a	7,519 c
SM117	101.33 b	23.45	2.27	19.15 ab	94.45	91.24 a	25.07 bc	9,066 a
'IR64'	99.03 c	23.02	2.29	18.53 b	87.98	92.44 a	27.78 a	8,613 ab

[z] Means with the same letter of a row are not significantly different at 5 % level by LSD test.

表 3. 2012 年二期作水田栽培下 'IR64' 和 7 個耐旱突變品系高級產量比較試驗之表現。

Table 3. Performance of 'IR64' and seven drought-tolerant mutant lines in the advanced yield trials under irrigated culture at the second cropping season of 2012.

Line or variety	Plant height (cm)	Panicle length (cm)	Panicle weight (g)	Panicle number (No.)	Spiketlet /panicle (No.)	Seed set (%)	1000-grain weight	Grain yield (kg ha^{-1})
SM13	79.20 e[z]	22.20 b	1.94 c	19.98	87.39 ab	80.52 b	24.49 c	4,037 b
SM36	80.50 de	21.56 c	2.32 ab	18.95	92.54 a	82.14 b	26.95 a	5,965 a
SM47	82.93 bc	22.41 ab	2.43 a	18.90	90.02 a	92.92 a	26.52 ab	6,577 a
SM72	86.20 a	22.91 a	2.36 a	16.75	90.01 a	91.80 a	26.47 ab	6,918 a
SM100	82.03 bcd	22.18 b	2.25 ab	18.00	87.81 a	92.39 a	26.50 ab	5,965 a
SM103	81.35 cd	22.24 b	2.13 bc	17.53	81.88 b	92.55 a	27.79 a	6,010 a
SM117	83.03 bc	22.64 ab	2.27 ab	18.60	91.58 a	90.07 a	24.77 c	6,169 a
'IR64'	83.48 b	22.38 ab	2.37 a	18.83	91.22 a	90.77 a	25.31 bc	6,396 a

[z] Means with the same letter of a row are not significantly different at 5 % level by LSD test.

對隱性基因控制之遺傳模式，而 SM76 突變品系則爲二對互補基因控制之遺傳模式。是以在 EMS 所誘發水稻之耐鹽性，其突變基因都爲少數基因控制之遺傳模式。且透過分子標幟輔助的方式，順利用將耐鹽特性轉移至 'IR64' 中；由於透過化學誘變劑誘發之變異多屬於少數基因或單基因的變異，尤其疊氮化鈉之誘變後代之大部份性狀並無顯著之影響 (Kleinhofs *et al*. 1974; Singh *et al*. 1981)，且其使用量少而誘變效率高，分解快又殘效少、致癌能力低 (Ulland *et al*. 1973)，因此相當符合誘變育種上創新種原的需求。而本研究透過幼苗期 20% PEG 6000 模擬缺水逆境之水耕液篩選方式，可於 1 個月內將大量的突變材料進行初步篩選，在參試材料數目大幅減少後，再以增加重複數降低環境影響所造成誤差，進而減少誤判耐旱等級之發生。最後再以 28% PEG 6000 篩選方式，快速篩選出缺水耐受性突變體，使篩選達到有效、快速、簡易及準確之要求，而短期內篩選出水稻幼苗期具高缺水耐受性之突變體。未來透過這些耐旱特性水稻突變品系之利用，快速創育出適合國人栽培利用之耐旱性水稻種原，加速水稻在耐旱育種的發展。

利用水稻幼苗 3 葉齡進行缺水耐受性測

定，其可預期材料之耐受特性將遭受環境因素影響，故試驗環境的均一性爲試驗設計之考量重點。而由於利用田間栽培測定，容易因田間小區間土壤水分含量有所不同而產生差異，使得處理間之缺水程度不易控制，造成材料因缺水處理之逆境程度不同而形成誤差，故本次試驗幼苗期乃採用水耕系統代替田間操作測定，並以高分子量的聚乙二醇水溶液模擬水分逆境，由於聚乙二醇不會被水稻根部及葉片吸收，故不會影響分析結果，可藉由滲透調節以模擬田間植株缺水情況 (Cui *et al*. 2008)。且由於聚乙二醇水溶液爲均質的狀態，不但處理時可提高各材料在水分逆境上的均勻性及一致性，更可藉由調整聚乙二醇水溶液濃度，探討不同缺水程度處理下，不同材料對逆境程度之反應，故高分子量的聚乙二醇目前已廣爲學者所使用，可代替水稻幼苗期田間缺水處理試驗 (Sinhababu & Kar 2003; Cui *et al*. 2008; Srividhya *et al*. 2011)。

由於多數學者指出水稻對乾旱逆境之反應會因水稻生育時期不同，其表現之缺水耐受性反應會有所不同，基此原因乃進一步利用水旱田兩種水分管理模式，探討經幼苗期 PEG 6000 篩選所得之突變品系於成株期田間耐旱性的差異，試驗結果有 11 個品系稻穀產量指數均高於 ‘IR64’ 對照品種，具有高產潛能，而亦有 10 個突變品系稻穀產量指數僅達 ‘IR64’ 約 50% 以上，顯示稻穀產量表現受到嚴重的影響。由此顯示，化學誘變雖已誘發水稻幼苗期之缺水耐受基因表現，但增加了幼苗期耐旱性基因表現，但對突變品系成株期稻穀產量其正負面影響均會出現。此種趨勢亦同樣發生在旱田試驗中，在旱田試驗中有 20 個突變品系 (15.9%) 之稻穀產量高於對照品種 ‘IR64’，呈現於成株期稻穀產量之正面效益。

藉由水旱田水稻成株期產量表現可了解水稻在分櫱盛期結束且逐漸進入生殖生長期時 (約接近孕穗期)，若遭遇缺水逆境時，其稻穀產量降低的程度可供評估參試材料之缺水耐受性，當旱田稻穀產量降低情形小時，則表示該品系對缺水逆境具有較高耐受性，即較具好的耐旱性。而由圖 5 之旱田與水田突變品系稻穀產量耐旱指數結果顯示，成株期較具耐旱潛力者有 74 個突變品系，佔所有參試品系比率爲 58.7%，顯示在旱田之乾旱逆境處理下，這些利用幼苗期篩選所得之缺水耐受性較高的突變品系，其在成株期在遭逢缺水影響時，仍有近 59% 突變品系之稻穀產量降低幅度較小，顯現出較高的耐旱特性。尤其 SM62、SM69、SM111、SM122、SM126 等 5 個突變品系之稻穀產量耐旱指數高於 150% 以上，顯示缺水處理對這些耐旱突變品系之稻穀產量具有正面效益，究其原因是否因台灣爲 2 期作連續水稻栽培制度，長期土壤處於湛水狀態，對土壤物化特性及稻株根部發育均有不利影響，而經過 24 d 的斷水處理反而出現正面效益。故未來可利用稻穀產量耐旱指數表現潛力優良之突變品系爲材料，發展台灣水稻之節水栽培模式，以達到降低栽培水稻之用水量及保障高產之稻穀收穫的目的，進而因應糧食安全上之需求。

多位學者已利用水旱田水稻產量表現來篩選缺水耐受性佳之水稻耐旱品種，如 Atlin *et al*. (2004) 指出非逆境雖較逆境下平均稻穀產量高 50%，但在不同族群且未經選拔之重組自交系中，產量基因型之平均在兩種環境間仍維持有正相關關係，因此可藉由產量潛能選拔方式，在中度乾旱環境下選育出產量維持一定表現之耐旱水稻品種 (Atlin *et al*. 2004)。此一結論與本次研究結果相當一致；而 Raman *et al*. (2012) 亦利用乾旱產量指數和平均產量指數進行 ‘ARB8’ 和 ‘IR55419-04’ 間之 129 個雜交品系和 39 個不同品種在水田、中度乾旱及高度乾旱等 3 種不同環境下進行耐旱性選拔研究，結果亦顯示可利用稻穀產表現可協助育種者進行耐旱基因型選拔。故未來國內在耐旱水稻育種上，其應可透過在水旱田兩種栽培下，利用產量耐旱指數的表現來選拔適合台灣利用的耐旱水稻品種。

在 SM13、SM36、SM47、SM72、SM100、SM103、SM117、SM130 等 9 個突變系成株期之缺水逆境處理中，結果顯示 SM36、SM47、SM72、SM100、SM103 及 SM117 是成株期較具缺水耐受性之品系，故此 6 個品系應是幼苗期及成株期均具缺水耐受

性之突變品系；而 SM13、SM66 及 SM130 等雖其幼苗期表現出高耐旱特性，唯其成株期之表現卻是對缺水逆境之反應敏感，其中除了 SM66 因植株之株高明顯矮化外，僅約 45 cm 左右，故造成了成株期生長軟弱且稻穀產量十分低下，因此不具實際利用價值。而 SM13 及 SM130 兩突變系，則僅是幼苗期具耐缺水逆境耐性而成株期不具耐受性之突變品系。若對照 9 個突變品系耐旱等級之表現，其結果亦顯示 SM36、SM47、SM72、SM100、SM103、SM117 等 6 個品系之耐旱等級表現較好，而以 SM13、SM66 及 SM130 表現等級較差。再者，由於稻穀產量之高低及耐旱等級之反應兩者之結果相當一致，未來於耐旱水稻育種選拔時，可利用稻穀產量表現進行選拔，如此應可於耐旱與敏感親本的雜交後代中，選育出具有缺水耐受性之耐旱水稻新品種。此一結果，與許多學者指出產量潛能的評估在非逆境與逆境下具正相關關係的結論相呼應 (Atlin *et al*. 2004; Bernier *et al*. 2007; Venuprasad *et al*. 2007)。尤其由高級產量試驗結果顯示，誘變已造成突變品系主要農藝特性產量發生差異，惟透過小區產量表現來看，如 SM100 及 SM117 在二個期作之稻穀產量均與對照 ‘IR64’ 相似，表現出高產潛能，顯示透過誘變操作可誘發栽培稻耐旱性改變，且獲選之耐旱品系在產量潛能上仍可達實用價值，是台灣水稻耐旱育種上值得嚐試之途逕。而本次試驗獲選之耐旱突變品系，未來將可供台灣一期作節水栽培及耐旱水稻育種利用。

水分缺乏會改變作物之外表型表現及農藝特性，降低作物之產量，影響程度則依乾旱時間點及發生時期的長短而定 (Jongdee *et al*. 2002)。且基本上乾旱影響水稻生產有 3 個模式，即早期、間歇性及後期乾旱逆境 (Fukai & Cooper 1995)。早期乾旱經常導致耕作或移植延遲，發生於營養生長最高分蘗期之早期乾旱對稻穀生產的影響較小，一般會導致分蘗數減少 (Boonjung & Fukai 1992; Jongdee *et al*. 2006)；在分蘗期至開花期間若發生間歇性或連續性乾旱，則外表型可能並未表現明顯之乾旱特徵，如葉片捲曲，但會導致產量大幅降低。其原因主要是葉片伸展及光合作用受到抑制而導致減產 (Fukai & Cooper 1995)。當乾旱於生長後期發生時，即於幼穗形成及開花期時，小穗稔實率降低是造成產量損失的主要因素 (Liu *et al*. 2006)。因此，不同的乾旱模式對作物會有不同的影響，於育種前，育種家應對不同生育期水稻耐旱性之評估，即選定育成抗何種乾旱模式的水稻品種是相當重要的，因爲它將會決定及影響抗旱水稻育種策略及操作的擬定 (Fukai & Cooper 1995)。

由試驗顯示，不同突變系其對缺水逆境之幼苗期與成株期之反應並不相同，因此進行耐旱性篩選時，宜根據各突變品系表現之耐旱機制分別進行。利用 PEG 6000 所進行之幼苗期模擬缺水逆境之篩選，其僅能區別幼苗期是否具耐旱性，其獲選材料成株期之缺水逆境之耐受性，仍需於田間進一步評估與測試，如此方能選育出全生育期均具缺水耐受性之耐旱水稻新品種。而由本試驗結果顯示，透過 PEG 6000 的篩選，大幅降低田間缺水耐受性之品系評估數目，故利用水泥槽進行較精密環境控制之缺水逆境試驗，從而獲得較精確之成株期缺水耐受性資料，據而選出全生育期均具缺水耐受性之耐旱突變品系，如 SM47 其稻穀產量及耐旱等級均表現優良，不但可供未來命成成耐旱水稻新品種，亦可供國內水稻耐旱育種時之耐旱種原親本來源，藉以因應全暖化下所帶來之缺水逆境危機。

引用文獻

Atlin, G. N., M. Laza, M. Amante, and H. R. Lafitte. 2004. Agronomic performances of tropical aerobic, irrigated, and traditional upland rice varieties in three hydrological environments at IRRI. *in*: Proceedings of the 4th International Crop 25 Science Congress. September 26–October 1, 2004. Brisbane, Australia. Australian Society of Agronomy, Brisbane.

Bernier, J., A. Kumar, V. Ramaiah, D. Spaner, and G. Atlin. 2007. A large-effect QTL for grain yield under reproductive stage drought stress in upland rice. Crop Sci. 47:507–516.

Bernier, J., G. N. Atlin, R. Serraj, A. Kumar, and D. Spaner. 2008. Review: Breeding upland rice for drought resistance. J. Sci. Food Agric. 88:927–939.

Boonjung, H. and S. Fukai 1996. Effects of soil water deficit at different growth stages on rice growth and yield under upland conditions. 2. Phenology, biomass production and yield. Field Crops Res. 48:47–55.

Chern, C. G. and C. S. Huang. 1984. Mutagenic efficiency of sodium azide on rice variety Tainung 67. J. Agric. Assoc. China. 33:345–353. (in Chinese with English abstract)

Chou, S. Y. 2004. Characteriztion of rice (*Oryza sativa L.*) Tainung 67 and its aromatic mutant SA0420 using proteomic approach. Master thesis. Department of Agronomy, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 106 pp. (in Chinese with English abstract)

Cui, K., J. Huang, Y. Xing, S. Yu, C. Xu, and S. Peng. 2008. Mapping QTLs for seedling characteristics under different water supply conditions in rice (*Oryza sativa L.*). Physiol. Plant. 132:53–68.

Evenson, R. E. and D. Gollin. 2003. Assessing the impact of the green revolution, 1960–2000. Science 300:758–762.

Fukai, S. and M. Cooper. 1995. Development of drought-resistant cultivars using physiomorphological traits in rice. Field Crops Res. 40:67–86.

Hazen, S. P., M. S. Pathan, A. Sanchez, I. Baxter, M. Dunn, B. Estes, H. S. Chang, T. Zhu, J. A. Kreps, and H. T. Nguyen. 2005. Expression profiling of rice segregating for drought tolerance QTLs using a rice genome array. Funct. Integr. Genomics 5:104–116.

Hirasawa, T. 1999. Physiological characterization of rice plant for tolerance of water deficit. p.89–98. *in*: Genetic Improvement of Rice for Water-Limited Environments. (Ito, O., J. C. O'Toole, and B. Hardy, eds.) International Rice Research Institute. Los Baños and Philippines. 353pp.

IRRI (International Rice Research Institute). 1996. Standard Evaluation System for Rice. International Rice Research Institute, Manila, Philippines. 52 pp.

IRRI (International Rice Research Institute). 2002. Rice almanac. IRRI; WARDA; CIAT; FAO, Los Banos. 249pp.

Jongdee, B., G. Pantuwan, S. Fukai, and K. Fischer. 2006. Improving drought tolerance in rainfed lowland rice: An example from Thailand. Agric. Water Manage. 80:225–240.

Jongdee, B., S. Fukai, and M. Cooper. 2002. Leaf water potential and osmotic adjustment as physiological traits to improve drought tolerance in rice. Field Crops Res. 76:153–163.

Jwo, W. S. 2007. Physiological characterizations of salt tolerance at germaination and seedling stages in rice (*Oryza sativa L.*) Tainung 67 mutants. Master thesis. Master programs of Life Sciences, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 122 pp. (in Chinese with English abstract)

Kamoshita, A., R. C. Babu, N. Manikanda Boopathi, and S. Fukai. 2008. Phenotypic and genotypic analysis of drought-resistance traits for development of rice cultivars adapted to rainfed environments. Field Crops Res. 109:1–23.

Khush, G. S. 2001. Green revolution: the way forward. Nat. Rev. Genet. 2:815–822.

Kikuchi, H. 1994. Improving the eating quality of rice using low amylose mutants. Gamma Field Symp. 33:1–17.

Kleinhofs, A., C. Sander, R. A. Nilan, and C. F. Konzak. 1974. Azide mutagenicity mechanism and nature of mutants produced. p.195–199. *in*: Proceedings of Polyploidy and Induced Mutations in Plant Breeding. October 2–10, 1972. Vienna, Austria. International Atomic Energy Agency, Vienna.

Kuo, S. C. 2012. The inheritance and marker-assisted selection of salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). Master thesis. Graduate Institute of Agronomy, National Chiayi University. Chiayi, Taiwan. 72 pp. (in Chinese with English abstract)

Li, Z. K. and J. L. Xu. 2007. Breeding for drought and salt tolerant rice (*Oryza sativa* L.): progress and perspectives. p.531–564. *in*: Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops. (Jenks, M. A., P. M. Hasegawa, and S. M. Jain, eds.) Springer. Dordrecht, Netherlands. 817pp.

Liao, Y. N. 2012. The genetic analysis and coarse mapping of the rice floury gene, *FLOURY ENDOSPERM6* (*FLO6*). Master Thesis. Graduate Institute of Agronomy, National Chiayi University. Chiayi, Taiwan. 73 pp. (in Chinese with English abstract)

Liu, J. X., D. Q. Liao, R. Oane, L. Estenor, X. E. Yang, Z. C. Li, and J. Bennett. 2006. Genetic variation in the sensitivity of anther dehiscence to drought stress in rice. Field Crops Res. 97:87–100.

Mackill, D. J., S. Fukai, and A. Blum. 2003. Indirect selection for physiological traits for drought tolerance. p.49–54. *in*: Breeding Rice for Drought-prone Environments. (Fisher, K. S., R. Lafitte, S. Fukai, G. Atlin, and B. Hardy, eds.) International Rice Research Institute. Los Baños and Philippines. 103pp.

Nguyen, H. T., R. C. Babu, and A. Blum. 1997. Breeding for drought resistance in rice: physiology and molecular genetics considerations. Crop Sci. 37:1426–1434.

Okuno, K. 1983. Inhertiance of induced mutations in rice, *Oryza sativa* L. and their application for rice breed-

ing. Bull. Natl. Inst. Agric. Sci., Series D 34:187–274.

O'Toole, J. C. 2004. Rice and water: The final frontier. p.1–26. *in*: Proceedings of The First International Conference on Rice for the Future. August 31–September 2, 2004. Bangkok. Thailand. The Rockefeller Foundation, Bangkok.

Pantuwan, G., S. Fukai, M. Cooper, S. Rajatasereekul, and J. C. O'Toole. 2002. Yield response of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes to drought under rainfed lowlands: 2. Selection of drought resistant genotypes. Field Crops Res. 73:169–180.

Price, A. H., J. E. Cairns, P. Horton, H. G. Jones, and H. Griffiths. 2002. Linking drought-resistance mechanisms to drought avoidance in upland rice using a QTL approach: Progress and new opportunities to integrate stomatal and mesophyll responses. J. Exp. Bot. 53:989–1004.

Raman, A., S. B. Verulkar, N. P. Mandal, M. Variar, V. D. Shukla, J. L. Dwivedi, B. N. Singh, O. N. Singh, P. Swain, A. K. Mall, S. Robin, R. Chandrababu, A. Jain, T. Ram, S. Hittalmani, S. Haefele, H. P. Piepho, and A. Kumar. 2012. Drought yield index to select high yielding rice lines under different drought stress severities. Rice 5:31.

Rosielle A. A. and J. Hamblin. 1981. Theoretical aspects of selection for yield in stress and non-stress environments. Crop Sci. 21:943–946.

Satoh, H. and T. Omura. 1981. New endosperm mutations induced by chemical mutagens in rice *Oryza sativa* L. Jpn. J. Breed. 31:316–326.

Singh, R. B., R. S. N. Pillai, and H. Kumar. 1981. Induced translocations in safflower. Crop Sci. 21:811–815.

Sinhababu, A. and R. K. Kar. 2003. Comparative responses of three fuel wood yielding plants to PEG-induced water stress at seedling stage. Acta Physiol. Plant. 25:403–409.

Srividhya, A., L. R. Vemireddy, P. V. Ramanarao, S. Sridhar, M. Jayaprada, G. Anuradha, B. Srilakshmi, H. K. Reddy, A. S. Hariprasad, and E. A. Siddiq. 2011. Molecular mapping of QTLs for drought related traits at seedling stage under PEG induced stress conditions in rice. Amer. J. Plant Sci. 2:190–201.

Ulland, B., E. K. Weisburger, and J. H. Weisburger. 1973. Chronic toxicity and carcinogenicity of industrial chemicals and pesticides. Toxicol. Appl. Pharmacol. 25:446.

Venuprasad, R., H. R. Lafitte, and G. N. Atlin. 2007. Response to direct selection for grain yield under drought stress in rice. Crop Sci. 47:285–293.

Wang, C. S., T. H. Tseng, and C. Y. Lin. 2002. Rice biotech research at the Taiwan agriculture research institute. APBN 6:950–956.

Wu, Y. P. and H. S. Lur. 2002. Rice mutation breeding. Chinese J. Agron. 12:219–239. (in Chinese with English abstract)

Wu, Y. P., P. Y. Ko, T. H. Tseng, and C. S. Wang. 2007. Screening for the scent and grain quality in rice mutants. J. Taiwan Agric. Res. 56:121–133. (in Chinese with English abstract)

Yen, C. C. 2011. Mutagenetic breeding and linkage-marker analyses of salt-tolerant rice. Doctoral dissertation. Department of Life Science, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 141 pp. (in Chinese with English abstract)

Yoshida, S. 1976. Routine procedures for growing rice plants in culture solution. p.61–66. *in*: Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice. (Yoshida, S., D. A. Forno, J. H. Cook, and K. A. Gomez, eds.) International Rice Research Institute. Manilla, Philippines. 83 pp.

Zhao, X. Q., J. L. Xu, M. Zhao, R. Lafitte, L. H. Zhu, B. Y. Fu, Y. M. Gao, and Z. K. Li. 2008. QTLs affecting morpho-physiological traits related to drought tolerance detected in overlapping introgression lines of rice (*Oryza sativa* L.). Plant Sci. 174:618–625.

Drought Tolerant Rice Lines by Screening an 'IR64' Mutant Stock

Yong-Pei Wu[1,*]

Abstract

Wu, Y. P. 2013. Drought tolerant rice lines by screening an 'IR64' mutant stock. J. Taiwan Agric. Res. 62(3):195–208.

Breeding new rice varieties with drought tolerance is one of important topics of modern breeding programs. In this study, we screened mutant lines of drought tolerance from a mutant stock of 'IR64' which was a widely cultivated cultivar in the world, and induced by sodium azide twice. A total of 152 mutant lines of drought tolerance out of 2,500 mutants were selected by using PEG 6000 to mimic water deficiency during the seedling stage. Consequently, the mutant lines of drought tolerance were evaluated grain yield harvested from paddy and upland cultivations. The yield indices were used to assess drought tolerance of each mutant line. As a result, up to 58.7% of mutant lines performed good potential for drought tolerance according to its index of yield drought-tolerance (the percentage of yields of paddy cultivation/upland cultivation). However, the nine mutant lines rated as scale 3 of drought tolerance at the seedling stage were assessed drought tolerance for multiple experimental field trials at the adult stage. The results revealed that all mutants exhibited same trend in yield and drought tolerance, and two mutant lines, SM47 and SM100, had the best performance. This study demonstrated the strategy of rice breeding for drought tolerance: first, screening drought tolerant lines by treatment of PEG 6000 during the seedling stage to exclude lots of materials with poor tolerance because of water deficiency; second, the selected lines were evaluated by the index of yield drought-tolerance. Therefore, this strategy may help rice breeders to facilitate breeding of new drought tolerant rice varieties in Taiwan.

Key words: Mutant lines, Drought tolerance, Rice.

Received: February 20, 2013; Accepted: May 14, 2013.
[*] Corresponding author, e-mail: wuypei@dns.caes.gov.tw
[1] Associate Research Fellow, Department of Agronomy, Chiayi Agricultural Experiment Station, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 62(3):209–224 (2013)
DOI: 10.6156/JTAR/2013.06203.02

非洲菊斑潛蠅繁殖時同齡幼蟲與成蟲在菜豆本葉上之種內競爭

錢景秦[1,*] 古琇芷[2] 張淑貞[3]

摘要

錢景秦、古琇芷、張淑貞。2013。非洲菊斑潛蠅繁殖時同齡幼蟲與成蟲在菜豆本葉上之種內競爭。台灣農業研究 62(3):209–224。

非洲菊斑潛蠅 [*Liriomyza trifolii* (Burgess)] (Diptera: Agromyzidae) 為世界性重要之園藝與蔬菜作物害蟲，進行該蠅生物防治與藥劑防治研究之前，必先建立其適當繁殖方法。本文利用菜豆 (*Phaseolus vulgaris* var. *communis* Aeschers) 苗飼育非洲菊斑潛蠅，希冀瞭解在菜豆苗本葉 (primary leaf) 不同葉寬下，該蠅同齡幼蟲與成蠅各在不同密度繁殖時之種內競爭，以提供該蠅及其寄生蜂較優之繁殖方法。試驗方法為在 25℃下，以三種葉寬等級之菜豆苗本葉 (小型葉寬 6.0–7.0 cm、中型葉寬 7.1–8.0 cm 及大型葉寬 8.1–9.0 cm)、17 種斑潛蠅幼蟲密度 (每葉第三齡幼蟲數 11–95 隻範圍內，自 11 隻起每增加 5 隻幼蟲即區分為一個等級，共分 17 個等級，另每葉 1–10 隻第三齡幼蟲者為 0 級對照組) 及 5 種斑潛蠅成蠅密度 (依成蠅 10、20、30、40 及 60 對與 20 株菜豆苗之比例分為 5 個密度：0.5、1.0、1.5、2.0 及 3.0 對/株) 進行試驗。結果得知菜豆苗本葉葉寬與幼蟲密度，除均對幼蟲存活率與蛹長等級 (I–V 級蛹長各為 1.85–2.11、1.67–1.82、1.49–1.63、1.31–1.45 及 1.05–1.27 mm) 有直接影響，且第三齡幼蟲間之競爭屬利用型競爭 (exploitation-type competition) 外；二者亦可經由蛹長等級間接影響羽化率、成蠅體長、雌性比、壽命、生育力 (fertility) 及取食刻點數。成蠅密度則顯著影響雌蠅之壽命與生育力。因而建議當繁殖非洲菊斑潛蠅時，在 25℃下，首日以 30 株無真葉 (mature leaf) 豆苗 (發根後 10–11 d，本葉寬 7.1–9.0 cm)，供 80 隻第 2 日齡已交尾雌蠅產卵 7 h，次日後每日需另補充 20 隻已交尾第 2 日齡雌蠅，以維持該蠅繁殖時定量之總雌蠅數。經 6 d 後，可選擇每豆苗本葉上第三齡幼蟲密度為 15–20 隻者，供非洲菊斑潛蠅繼代繁殖；20–30 隻者，則供該蠅幼蟲寄生蜂—異角釉小蜂 [*Hemiptarsenus varicornis* (Girault)] 與華釉小蜂 [*Neochrysocharis formosa* (Westwood)] 之繁殖。

關鍵詞：非洲菊斑潛蠅、種內競爭、繁殖、菜豆。

前言

非洲菊斑潛蠅 [*Liriomyza trifolii* (Burgess)] 原分布於新北區與新熱帶區 (Minkenberg & van Lenteren 1986)，由於鑑定錯誤、檢疫疏忽及藥劑防治不易等原因，該蠅已爲世界性重要之園藝與蔬菜作物害蟲 (Lindquist 1983; Minkenberg & van Lenteren 1986)。台灣於 1988 年 2 月首次發現該蠅入侵危害台中市大坑地區之非洲菊 (*Gerbera jamesonii* Bolues ex Hook. f.)，同年 10 月迅速擴散至中部地區危害菊科花卉與豆科蔬菜 (Wang 1988; Wang & Lin 1988)。

爲進行非洲菊斑潛蠅之生物防治與藥劑防治研究，必先建立該蠅之適當繁殖方法並瞭解其繁殖時之種內競爭，以便獲得量多質優之蟲體供試驗用。有關非洲菊斑潛蠅之繁殖方

投稿日期：2013 年 2 月 25 日；接受日期：2013 年 5 月 21 日。
* 通訊作者：chien@tari.gov.tw
1 農委會農業試驗所應用動物組前研究員。台灣 台中市。
2 農委會農業試驗所應用動物組研究助理。台灣 台中市。
3 農委會農業試驗所應用動物組助理研究員。台灣 台中市。

法，目前尚無成功的人工飼料法，而 Parrella (1983) 雖曾利用菊花飼養該蠅並進行該幼蟲間之競爭試驗，但 Rathman *et al*. (1991) 認爲菊花栽培期長，當繁殖一種非洲菊斑潛蠅釉癭小蜂 *Ganaspidium utilis* Beardsley 時，以矮生萊豆 (Bush lima bean, *Phaseolus limensis* var. *limenanus* L. H. Bailey cv. 'Henderson') 爲寄主植物，可顯著提高非洲菊斑潛蠅與寄生蜂繁殖之經濟效益。

本文乃利用菜豆 (*Phaseolus vulgaris* var. *communis* Aeschers) 苗飼育非洲菊斑潛蠅，希冀瞭解在菜豆苗本葉 (primary leaf) 不同葉寬下，該蠅同齡幼蟲與成蟲各在不同密度繁殖時之種內競爭，以提供該蠅及其寄生蜂較優之繁殖方法。

材料與方法

供試蟲源

在台中市大坑非洲菊栽培園，採集於 1993 年被非洲菊斑潛蠅幼蟲危害之葉片攜回室內，攤開葉片置放在塑膠盤內，待老熟幼蟲鑽出葉片化蛹後，收集蠅蛹於玻璃皿內。待成蠅羽化供做飼育之蟲源。

寄主植物之栽培與本葉葉寬之分級

隔日定期浸泡菜豆 (又名花豆) 種子 200 粒，在 25℃下經 8 h 種子吸水飽滿後，將其洗淨、瀝乾、裝入塑膠盤 (長 48.0 cm、寬 34.0 cm、高 2.5 cm)、並風乾 0.5 h。其後再以相同大小之塑膠盤覆蓋催芽，待 14–20 h 種子發根後，即移種溫室內置有 3 號蛭石之穴盤 (長 36.5 cm、高 4.5 cm，30 穴) 內，每日澆水。經 10–11 d 後，菜豆苗長高至 15–20 cm 時移入實驗室。依豆苗本葉基部最寬處爲準，分爲小型葉 (葉寬 6.0–7.0 cm)、中型葉 (葉寬 7.1–8.0 cm) 及大型葉 (葉寬 8.1–9.0 cm) 三種葉寬等級。另利用葉面積儀 (LI-3000A, LI-COR Inc., NE, USA) 測量各葉寬等級之葉面積，並進行葉寬與其葉面積間之直線迴歸，每一處理組進行 15–27 重複。

不同本葉葉寬下幼蟲密度對幼蟲、蛹及成蠅之影響

幼蟲密度對幼蟲存活率與蛹長之影響：在 25℃定溫下、將前述三種不同本葉葉寬等級之無真葉菜豆苗，供不同密度斑潛蠅成蠅產卵，待幼蟲發育爲第三齡中期 (產卵後 6 d) 時，計數每豆葉上之幼蟲數並區分幼蟲密度等級，同時將每片豆葉自葉基部剪下分裝入各個塑膠培養皿 (diam. 9.0 cm) 內。經 3 d 後記錄各幼蟲密度等級中之葉內幼蟲死亡率、畸形蛹率 (化蛹不正常率)、幼蟲存活率 [1 – (葉內幼蟲死亡率 + 畸形蛹率)] 及各蛹長等級之百分率，每一處理組取樣 2–6 葉片，各進行 3 重複。斑潛蠅幼蟲密度等級之區分，係筆者等在該蠅飼養中考量豆葉大小、斑潛蠅幼蟲爲害密度之上下限、及其適當級距等，於每葉第三齡幼蟲數 11–95 隻範圍內，自 11 隻起每增加 5 隻幼蟲即區分爲一個等級，共分 17 個等級，另每葉 1–10 隻第三齡幼蟲者爲 0 級 (對照組)。蛹長等級係參照 Parrella (1983) 對非洲菊斑潛蠅大、小蛹之長度區分，及筆者等在該蠅飼養與前置試驗中對其蛹長分布範圍之瞭解，遂依其長度共區分爲 I 級蛹 (1.85–2.11 mm)、II 級蛹 (1.67–1.82 mm)、III 級蛹 (1.49–1.63 mm)、IV 級蛹 (1.31–1.45 mm) 及 V 級蛹 (1.05–1.27 mm)。

蛹長等級對蛹長與蛹重之影響：不同蛹長等級中蛹體長度與重量之測定，是在幼蟲化蛹後之第 2 日，在每一蛹長等級中各逢機選取 30 個蛹測量其長度，另以 50 個蛹爲一單位測量其重量，每一處理組進行 4–13 重複。

蛹長對羽化率、雌性比及成蠅體長之影響：25℃下於前項各不同蛹長等級中，逢機選取 50 個蛹裝入指形管 (diam. 1.5 cm、高 7.0 cm) 內，其後記錄各處理組之羽化率、雌性比及成蠅體長。羽化率與雌性比之試驗，每一處理組進行 5 重複，成蠅體長試驗每一處理組進行 2–30 重複。

蛹長對成蠅壽命、生育力 (fertility)、子代雌性比及取食刻點數之影響：在 25℃定溫與光週期 7 L：17 D 下，前項各不同蛹長等級中，逢機選取 1 對初羽化成蠅引入玻璃筒

(diam. 12.0 cm、高 22.0 cm) 內，每日供應 1 株新鮮無真葉菜豆苗 (本葉葉寬 7.1–9.0 cm) 與蜂蜜，直至供試成蠅死亡爲止，其間記錄各處理組成蠅之壽命、生育力、子代雌性比及取食刻點數，每一處理組進行 5–10 重複。

成蠅密度對其日存活率、壽命及生育力之影響

在 25℃ 定溫、相對濕度 65–85%、3 支日光燈 (20 W/支) 照明及光週期 7 L：17 D 下，將已發育可供試驗用之 20 株無真葉菜豆苗 (本葉葉寬 7.1–9.0 cm) 同置一如前述之穴盤，並將其移至各繁殖用網箱 (長 75.0 cm、寬 55.0 cm、高 50.0 cm，92 網目) 內，豆苗距光源 50 cm。另依斑潛蠅成蠅與菜豆苗之五種不同比例 (0.5：1.0、1.0：1.0、1.5：1.0、2.0：1.0 及 3.0：1.0)，每一繁殖用網箱各引入初羽化之成蠅 10、20、30、40 及 60 對。爲顧及試驗之準確性，每日上午 9 時在更新各繁殖用網箱內新鮮豆苗株數時，先在網箱外之一側設置燈光並將水噴霧於網上，再驚擾並誘集棲息原豆苗株上之成蠅，趁其在網上取食時，再以吸蟲管將成蠅換置於壓克力筒 (diam. 20 cm、高 25 cm) 內，計數各處理組之成蠅數，並餵食蜂蜜；同時亦視各處理組之活雌蠅數，依各原處理組成蠅與菜豆苗之比例，每日更新各繁殖用網箱內所需之新鮮豆苗株數，直至供試用之成蠅死亡爲止。每日換出已產有蠅卵之豆株均移至另一25℃、光週期7 L：17 D之室內放置。試驗期間除記錄成蠅每日齡存活率、壽命外，於產卵後 6 d 亦參照 Chien & Ku (1996) 之方法利用透光法，記錄各處理雌蠅每葉日產有活力卵數 (viable eggs，即第三齡幼蟲數)、日產有活力總卵數及終生產有活力總卵數，每一處理組進行 3 重複。

統計分析

各項處理之試驗資料，利用 SAS-EG (SAS Enterprise Guide) 4.1 版本統計分析軟體先進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，再以最小顯著差異性 (least significant difference; LSD) 測驗，在 5% 顯著水準下比較處理間平均值之差異。若遇百分率時，資料先進行角度轉換 (arcsine transformation)，再進行分析。

結果

不同本葉葉寬時葉寬與葉面積之關係

豆苗本葉分小型葉 (葉寬爲 6.0–7.0 cm)、中型葉 (葉寬爲 7.1–8.0 cm) 及大型葉 (葉寬爲 8.1–9.0 cm) 三種不同葉寬等級時，在各相同葉寬等級內，各葉寬與其葉面積間均無直線迴歸關係 ($P > 0.05$) (圖 1)；而在三種不同葉寬等級中，各葉面積間則呈顯著差異 (表 1)，小型葉者平均葉面積爲 31.2 $cm^2 \pm 0.7$ cm^2，中型葉者爲 39.5 $cm^2 \pm 0.7$ cm^2，大型葉者爲 47.8 $cm^2 \pm 1.0$ cm^2，顯示三種不同葉寬等級之

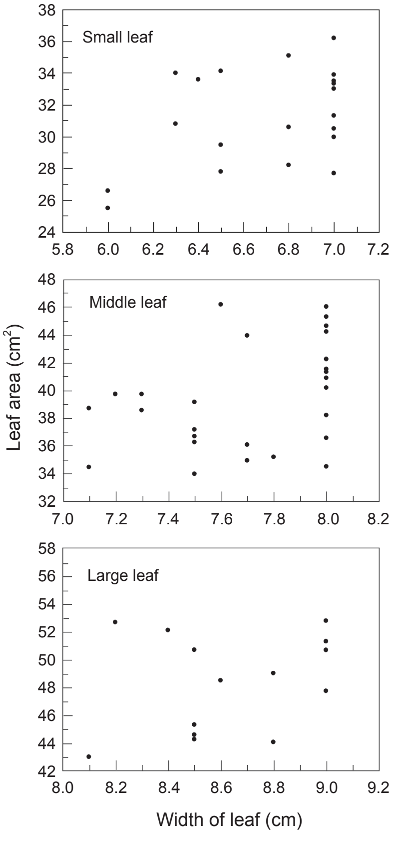

圖 1. 菜豆本葉三種葉寬等級之葉寬與葉面積關係。

Fig. 1. The relationship between leaf width and area based on three width grades of primary leaves in the field bean.

區劃具有實質意義。

不同本葉葉寬下幼蟲密度對幼蟲、蛹及成蠅之影響

幼蟲存活率：豆苗本葉之葉寬與斑潛蠅第三齡幼蟲密度，均對斑潛蠅幼蟲存活率有直接顯著影響。在小型葉 (寬 6.0–7.0 cm) 上當斑潛蠅第三齡幼蟲密度等級為 1–6 級 (11–40 隻/葉)、中型葉 (寬 7.1–8.0 cm) 上幼蟲密度等級為 1–10 級 (11–60 隻/葉) 及大型葉 (寬 8.1–9.0 cm) 上幼蟲密度等級為 1–12 級 (11–70 隻/葉) 時，斑潛蠅幼蟲存活率皆為 96.8–100%，與各幼蟲密度等級為 0 級 (1–10 隻/葉，對照組) 時之幼蟲存活率間均無顯著差異，其餘各處理組則與各對照組間均呈顯著差異 (表 2、3、4)，顯見在中型葉、大型葉上能承受斑潛蠅幼蟲較高密度之取食。同時在小型葉、中型葉及大型葉上，不論斑潛蠅第三齡幼蟲密度為 1–17 級 (11–95 隻/葉)，葉內幼蟲死亡率皆為 0.0–1.8%，與各對照組間均無顯著差異 (表 5)。在小型葉上僅當斑潛蠅第三齡幼蟲密度等級為 1 級

表 1. 菜豆本葉三種葉寬等級對葉面積之影響。

Table 1. Effect of three grades of width on area of field bean primary leaves.

Grades of leaf width	n	Leaf area (cm^2)
Small leaf (6.0–7.0 cm)	20	31.2 ± 0.7 c[z]
Middle leaf (7.1–8.0 cm)	27	39.5 ± 0.7 b
Large leaf (8.1–9.0 cm)	15	47.8 ± 1.0 a

[z] Mean ± standard error. Means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by LSD test.

表 2. 在菜豆小型本葉上非洲菊斑潛蠅幼蟲密度對其蛹長等級分布機率與幼蟲存活率之影響。

Table 2. Effect of *Liriomyza trifolii* larval density on its normalized distribution of the pupal length grades and larval survival from field bean small primary leaves (width 6.0–7.0 cm).

Grades of 3rd larval density (no. larvae $leaf^{-1}$)[z]	Normalized distribution (%) of pupal length grades[y]						Survival (%) of larval stage[x]
	I	II	I + II	III	IV	V	
0 (1–10)	25.2 ± 11.8 a[w]	61.4 ± 8.2 a	86.6 ± 5.9 a	13.4 ± 5.9 de	0.0 ± 0.0 h	0.0 ± 0.0 fg	100.0 ± 0.0 a
1 (11–15)	20.1 ± 2.9 ab	41.5 ± 6.1 b	61.7 ± 3.4 b	31.8 ± 3.3 abc	6.5 ± 2.6 g	0.0 ± 0.0 fg	100.0 ± 0.0 a
2 (16–20)	22.1 ± 5.0 a	36.3 ± 4.6 bcd	58.4 ± 2.1 bc	32.0 ± 0.4 ab	8.4 ± 2.7 g	0.0 ± 0.0 fg	98.8 ± 1.2 ab
3 (21–25)	8.2 ± 0.5 cd	40.2 ± 0.9 bc	48.5 ± 0.4 bcd	42.1 ± 2.2 a	6.8 ± 2.3 g	0.2 ± 0.2 fg	97.6 ± 0.6 abcd
4 (26–30)	8.6 ± 1.8 cd	35.4 ± 6.4 bcde	44.0 ± 5.6 cde	40.8 ± 3.2 ab	12.9 ± 2.2 fg	0.0 ± 0.0 g	97.8 ± 0.4 abcd
5 (31–35)	6.5 ± 3.5 cde	22.8 ± 2.3 efg	29.3 ± 5.8 fgh	44.8 ± 4.0 a	20.3 ± 2.9 def	3.7 ± 0.8 f	98.1 ± 0.6 abc
6 (36–40)	9.1 ± 0.5 bc	27.2 ± 2.8 cdef	36.2 ± 2.7 def	38.4 ± 1.2 ab	20.4 ± 3.0 cdef	2.3 ± 1.2 fg	97.3 ± 1.0 abcd
7 (41–45)	8.2 ± 1.4 cd	28.2 ± 2.4 bcdef	36.2 ± 3.4 def	40.6 ± 2.7 ab	17.9 ± 2.5 ef	1.0 ± 0.7 fg	95.8 ± 1.2 bcde
8 (46–50)	9.9 ± 3.6 bc	23.4 ± 1.9 defg	33.3 ± 1.9 efg	37.8 ± 5.2 ab	20.5 ± 3.4 cdef	4.1 ± 2.2 fg	95.7 ± 0.3 bcde
9 (51–55)	2.5 ± 2.5 ef	12.1 ± 5.3 h	14.6 ± 7.7 ij	33.7 ± 2.9 ab	33.7 ± 5.4 ab	13.1 ± 5.6 e	95.1 ± 1.1 cdef
10 (56–60)	2.5 ± 1.3 def	17.6 ± 2.0 fgh	20.1 ± 3.2 ghi	34.7 ± 7.3 ab	22.7 ± 2.4 bcde	17.8 ± 3.9 cde	95.3 ± 2.1 bcde
11 (61–65)	3.6 ± 1.1 cdef	14.4 ± 0.8 gh	18.0 ± 1.6 hij	33.4 ± 1.4 ab	30.5 ± 4.3 abcd	13.9 ± 3.0 de	95.7 ± 1.4 bcde
12 (66–70)	1.2 ± 1.2 ef	9.7 ± 4.9 h	10.9 ± 6.1 j	27.0 ± 2.6 bc	30.8 ± 3.4 abc	25.4 ± 0.8 bc	94.2 ± 1.3 def
13 (71–75)	0.0 ± 0.0 f	2.3 ± 1.7 i	2.3 ± 1.7 k	32.6 ± 5.6 ab	32.8 ± 21.9 ab	24.8 ± 4.2 bcd	92.4 ± 0.9 efg
14 (76–80)	0.0 ± 0.0 f	1.1 ± 0.6 i	1.5 ± 0.2 k	27.8 ± 6.7 bc	32.3 ± 4.7 ab	32.4 ± 2.3 ab	93.6 ± 0.3 ef
15 (81–85)	0.0 ± 0.0 f	1.2 ± 0.7 i	1.2 ± 0.7 k	30.1 ± 3.3 abc	33.2 ± 4.9 ab	27.1 ± 7.1 bc	91.6 ± 3.4 fg
16 (86–90)	0.0 ± 0.0 f	1.3 ± 1.3 i	1.3 ± 1.3 k	19.0 ± 4.0 cd	41.1 ± 2.6 a	27.6 ± 2.4 bc	89.1 ± 1.2 g
17 (91–95)	0.0 ± 0.0 f	0.0 ± 0.0 i	0.0 ± 0.0 k	10.2 ± 5.1 e	36.2 ± 5.5 a	43.6 ± 10.4 a	89.9 ± 0.3 g

[z] Two–six leaves were sampled per replicate, three replicates per larval density grade.
[y] The pupal length is 1.85–2.11, 1.67–1.82, 1.49–1.63, 1.31–1.45, and 1.05–1.27 mm, for grades I, II, III, IV, and V, respectively.
[x] Survival (%) of larval stage = [1 – (the larval mortality in the leaf + abnormal pupae)] × 100.
[w] Mean ± standard error. Means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by LSD test. Percentage data were arcsin-square-root transformed prior to analysis.

表 3. 在菜豆中型本葉上非洲菊斑潛蠅幼蟲密度對其蛹長等級分布機率與幼蟲存活率之影響。

Table 3. Effect of *Liriomyza trifolii* larval density on its normalized distribution of the pupal length grades and larval survival from field bean middle primary leaves (width 7.1–8.0 cm).

Grades of 3rd larval density (no. larvae leaf^{-1})^{z}	Normalized distribution (%) of pupal length grades^{y}						Survival (%) of larval stage^{x}
	I	II	I + II	III	IV	V	
0 (1–10)	26.0 ± 7.5 a^{w}	64.7 ± 1.9 a	90.7 ± 5.6 a	9.4 ± 5.6 e	0.0 ± 0.0 fg	0.0 ± 0.0 fg	100.0 ± 0.0 a
1 (11–15)	25.7 ± 3.8 a	43.2 ± 1.7 b	68.9 ± 2.3 b	31.1 ± 2.3 abc	0.0 ± 0.0 g	0.0 ± 0.0 g	100.0 ± 0.0 a
2 (16–20)	22.9 ± 1.6 a	39.5 ± 3.6 bc	62.3 ± 5.1 bc	35.9 ± 4.6 ab	1.3 ± 0.1 fg	0.0 ± 0.0 g	99.5 ± 0.5 a
3 (21–25)	12.3 ± 6.1 b	41.0 ± 3.2 b	53.3 ± 6.9 bcd	41.2 ± 6.9 a	4.4 ± 1.6 f	0.0 ± 0.0 g	98.9 ± 1.1 a
4 (26–30)	9.8 ± 2.0 b	38.6 ± 1.0 bc	48.4 ± 2.6 cde	38.7 ± 2.9 ab	10.8 ± 2.2 e	0.3 ± 0.3 g	98.2 ± 0.6 ab
5 (31–35)	8.0 ± 5.6 bcdef	36.4 ± 0.4 bcd	44.5 ± 5.9 cdef	39.0 ± 3.8 ab	14.6 ± 6.4 e	0.7 ± 0.4 fg	98.8 ± 0.2 a
6 (36–40)	10.0 ± 0.3 b	35.3 ± 4.7 bcd	45.3 ± 4.9 cdef	36.0 ± 1.2 ab	16.1 ± 3.4 de	1.1 ± 0.4 efg	98.5 ± 0.2 a
7 (41–45)	8.9 ± 0.8 bc	35.4 ± 1.4 bcd	44.3 ± 0.6 cdef	38.9 ± 1.5 ab	13.4 ± 1.2 e	0.5 ± 0.3 g	97.1 ± 0.3 abc
8 (46–50)	7.8 ± 1.2 bcd	35.1 ± 2.2 bcd	48.0 ± 2.4 def	33.5 ± 2.8 abc	16.8 ± 0.8 de	4.1 ± 1.1 def	97.2 ± 0.7 abc
9 (51–55)	6.8 ± 1.6 bcde	21.2 ± 3.9 ef	28.0 ± 5.4 fg	34.2 ± 1.6 abc	28.3 ± 3.8 bc	7.2 ± 1.3 cd	97.7 ± 0.2 abc
10 (56–60)	2.8 ± 1.3 cdefg	27.7 ± 2.8 cde	30.5 ± 4.2 efg	31.9 ± 3.6 abc	28.0 ± 3.3 bc	6.4 ± 1.9 cd	96.8 ± 0.8 abc
11 (61–65)	2.3 ± 1.9 efg	25.2 ± 2.6 def	27.5 ± 2.4 fg	41.1 ± 3.2 a	17.7 ± 3.6 de	6.1 ± 3.1 de	92.4 ± 2.1 de
12 (66–70)	1.7 ± 0.4 defg	17.9 ± 0.8 ef	19.7 ± 1.1 g	35.8 ± 1.6 ab	25.1 ± 2.9 bcd	12.0 ± 1.6 bc	92.6 ± 1.9 de
13 (71–75)	1.4 ± 0.7 fg	15.9 ± 4.1 f	17.3 ± 4.5 gh	31.9 ± 3.5 abc	27.4 ± 3.6 bc	18.4 ± 3.6 ab	95.0 ± 1.6 cd
14 (76–80)	0.7 ± 0.7 g	3.9 ± 3.4 g	4.6 ± 4.1 i	20.0 ± 7.6 d	41.6 ± 3.9 a	28.8 ± 7.5 a	95.0 ± 0.6 bcd
15 (81–85)	2.0 ± 1.4 efg	6.6 ± 4.2 g	8.7 ± 4.6 hi	27.8 ± 3.9 bcd	24.2 ± 3.5 cd	27.4 ± 3.8 a	88.1 ± 2.0 f
16 (86–90)	2.5 ± 1.3 defg	6.8 ± 3.9 g	9.3 ± 5.3 hi	23.5 ± 5.3 cd	35.8 ± 6.3 ab	22.3 ± 4.5 a	90.9 ± 0.9 ef
17 (91–95)	0.0 ± 0.0 g	6.9 ± 1.9 g	6.9 ± 1.9 hi	29.1 ± 3.4 abcd	34.2 ± 2.8 abc	21.3 ± 5.4 a	91.5 ± 1.8 e

[z] Two–six leaves were sampled per replicate, three replicates per larval density grade.
[y] The pupal length is 1.85–2.11, 1.67–1.82, 1.49–1.63, 1.31–1.45, and 1.05–1.27 mm, for grades I, II, III, IV, and V, respectively.
[x] Survival (%) of larval stage = [1 – (the larval mortality in the leaf + abnormal pupae)] × 100.
[w] Mean ± standard error. Means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by LSD test. Percentage data were arcsin-square-root transformed prior to analysis.

(11–15 隻/葉) 與 2 級 (16–20 隻/葉)、中型葉上幼蟲密度等級爲 1–3 級 (11–25 隻/葉) 及大型葉上幼蟲密度等級爲 1–12 級 (11–70 隻/葉) 時，斑潛蠅畸形蛹率各爲 0.0 與 1.2、0.0–1.1 及 0.0–2.0%，各與對照組間均無顯著差異 (表 5)；其餘在小型葉上當幼蟲密度等級爲 3–17 級 (21–95 隻/葉)、中型葉上幼蟲密度等級爲 4–17 級 (26–95 隻/葉) 及大型葉上幼蟲密度等級爲 13–17 級 (71–95 隻/葉) 時，斑潛蠅畸形蛹率各爲 1.3–9.7、1.1–10.1 及 2.6–4.2%，各處理組與各對照組間均呈顯著差異 (表 5)。

蛹長等級分布之機率：豆苗本葉之葉寬與斑潛蠅第三齡幼蟲密度，均對其蛹長等級分布之機率有顯著影響 (表 2、3、4)。在小型葉、中型葉上，當斑潛蠅第三齡幼蟲密度等級同爲 1 級與 2 級，及大型葉上幼蟲密度等級爲 1–4 級時，蛹長等級爲 I 級者，各占 20.1 與 22.1、25.7 與 22.9 及 18.4–24.1%，各與各 0 級 (對照組) 之 25.2、26.0 及 32.4% 間均無顯著差異。在小型葉、中型葉及大型葉上，不論斑潛蠅第三齡幼蟲密度等級爲 1–17 級時，蛹長等級爲 II 級者，各占 0.0–41.5、3.9–43.2 及 11.7–43.0%，均與各對照組之 61.4、64.7 及 54.9% 呈顯著差異。在小型葉、中型葉及大型葉上，斑潛蠅第三齡幼蟲密度等級爲 1–17 級時，蛹長等級爲 I 級與 II 級合計者，各占 0.0–61.7、4.6–68.9 及 11.7–67.1%，均各與各對照組之 86.6、90.7 及 87.3% 呈顯著差異。在小型葉上斑潛蠅第三齡幼蟲密度等級爲 1–15 級、中型葉與大型葉上幼蟲密度等

表 4. 在菜豆大型本葉上非洲菊斑潛蠅幼蟲密度對其蛹長等級分布機率與幼蟲存活率之影響。

Table 4. Effect of *Liriomyza trifolii* larval density on its normalized distribution of the pupal length grades and larval survival from field bean large primary leaves (width 8.1–9.0 cm).

Grades of 3rd larval density (no. larvae leaf^{-1})^{z}	Normalized distribution (%) of pupal length grades^{y}						Survival (%) of larval stage^{x}
	I	II	I + II	III	IV	V	
0 (1–10)	32.4 ± 14.9 a^{w}	54.9 ± 9.6 a	87.3 ± 6.4 a	12.7 ± 6.4 e	0.0 ± 0.0 j	0.0 ± 0.0 g	100.0 ± 0.0 a
1 (11–15)	24.1 ± 3.4 ab	43.0 ± 0.3 b	67.1 ± 3.0 b	29.6 ± 3.3 d	3.3 ± 0.3 hij	0.0 ± 0.0 g	100.0 ± 0.0 a
2 (16–20)	19.5 ± 3.3 abc	32.9 ± 5.3 bc	52.4 ± 6.3 bcde	43.7 ± 4.1 ab	3.9 ± 3.2 ij	0.0 ± 0.0 g	100.0 ± 0.0 a
3 (21–25)	20.9 ± 2.3 abc	38.2 ± 0.8 bc	59.0 ± 2.9 bc	32.5 ± 3.3 cd	7.6 ± 0.4 ghi	0.0 ± 0.0 g	99.2 ± 0.4 ab
4 (26–30)	18.4 ± 3.9 abcd	39.1 ± 0.9 bc	57.5 ± 3.3 bc	34.6 ± 1.9 abcd	6.5 ± 2.8 ghi	0.0 ± 0.0 g	98.6 ± 0.7 ab
5 (31–35)	16.8 ± 6.3 bcde	37.5 ± 1.4 bc	54.3 ± 5.8 bcd	33.3 ± 2.6 bcd	9.9 ± 2.6 efg	1.1 ± 0.1 ef	98.7 ± 0.8 ab
6 (36–40)	17.3 ± 4.8 bcd	36.4 ± 5.0 bc	53.7 ± 4.8 bcde	35.6 ± 2.5 abcd	8.6 ± 2.2 fgh	0.9 ± 0.9 fg	98.9 ± 0.8 ab
7 (41–45)	16.2 ± 1.0 bcde	37.6 ± 3.5 bc	53.8 ± 2.8 bcde	39.7 ± 0.6 abcd	5.0 ± 2.5 hi	0.5 ± 0.5 fg	99.0 ± 0.3 ab
8 (46–50)	11.3 ± 3.1 cdef	36.1 ± 2.9 bc	47.4 ± 0.3 cdef	41.2 ± 3.6 abc	10.3 ± 3.0 efg	0.2 ± 0.2 fg	99.1 ± 0.5 ab
9 (51–55)	6.7 ± 1.5 efg	34.7 ± 1.7 bc	41.5 ± 2.0 def	37.3 ± 2.2 abcd	15.8 ± 2.8 def	4.2 ± 1.3 d	98.7 ± 0.6 ab
10 (56–60)	8.7 ± 1.3 defg	31.1 ± 1.6 c	39.8 ± 2.6 def	44.2 ± 2.9 a	10.4 ± 2.3 efg	4.0 ± 1.6 de	98.4 ± 0.6 abc
11 (61–65)	8.4 ± 2.5 defg	31.1 ± 3.2 c	39.5 ± 3.9 ef	34.0 ± 2.4 abcd	17.3 ± 1.1 cde	7.0 ± 0.5 cd	97.7 ± 1.6 abcd
12 (66–70)	4.0 ± 1.0 fgh	30.0 ± 3.6 c	34.0 ± 4.2 f	35.1 ± 2.3 abcd	19.2 ± 2.1 bcd	9.5 ± 2.4 c	97.8 ± 1.6 abcd
13 (71–75)	0.3 ± 0.2 hi	13.6 ± 2.9 d	13.9 ± 2.9 g	34.1 ± 4.8 abcd	31.3 ± 3.8 a	16.8 ± 3.1 ab	96.1 ± 0.8 cd
14 (76–80)	0.2 ± 0.2 hi	17.7 ± 2.7 d	17.9 ± 2.9 g	34.7 ± 2.4 abcd	31.5 ± 1.8 a	11.7 ± 2.5 bc	95.8 ± 0.8 d
15 (81–85)	0.9 ± 0.5 hi	15.1 ± 2.2 d	16.1 ± 2.6 g	37.2 ± 2.5 abcd	32.1 ± 0.7 a	11.6 ± 1.7 bc	97.0 ± 1.6 bcd
16 (86–90)	2.2 ± 0.7 ghi	17.4 ± 2.3 d	19.7 ± 2.0 g	38.7 ± 2.0 abcd	27.5 ± 1.4 ab	10.9 ± 1.5 bc	96.8 ± 0.5 bcd
17 (91–95)	0.0 ± 0.0 i	11.7 ± 1.9 d	11.7 ± 1.9 g	38.8 ± 1.3 abcd	26.1 ± 2.2 abc	18.8 ± 2.3 a	95.4 ± 0.6 d

[z] Two–six leaves were sampled per replicate, three replicates per larval density grade.
[y] The pupal length is 1.85–2.11, 1.67–1.82, 1.49–1.63, 1.31–1.45, and 1.05–1.27 mm, for grades I, II, III, IV, and V, respectively.
[x] Survival (%) of larval stage = [1 – (the larval mortality in the leaf + abnormal pupae)] × 100.
[w] Mean ± standard error. Means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by LSD test. Percentage data were arcsin-square-root transformed prior to analysis.

級同為 1–17 級時，蛹長等級為 III 級者，各占 27.0–44.8、20.0–41.2 及 29.6–44.2%，均各與各對照組之 13.4、9.4 及 12.7% 呈顯著差異。在小型葉上斑潛蠅第三齡幼蟲密度等級為 1–17 級、中型葉上幼蟲密度等級為 4–17 級、及大型葉上幼蟲密度等級為 3–17 級時，蛹長等級為 IV 級者，各占 6.5–41.1、10.8–41.6 及 5.0–32.1%，均各與各對照組間呈顯著差異。在小型葉、中型葉及大型葉上斑潛蠅第三齡幼蟲密度等級同為 9–17 級時，蛹長等級為 V 級者，各占 13.1–43.6、6.1–28.8 及 4.0–18.8%，均各與各對照組間呈顯著差異。

蛹長等級對蛹長與蛹重之影響：蛹長與蛹重均隨蛹長等級之增加而漸減 (表 6)。當蛹長等級分為 I、II、III、IV 及 V 級時，各等級蛹之平均蛹長各為 1.93、1.70、1.59、1.36 及 1.17 mm，各蛹長等級間蛹長差異顯著。各蛹長等級內 50 個蛹之平均總蛹重，各為 28.6、22.1、17.8、13.7 及 7.0 mg，各蛹長等級間蛹重呈顯著差異。

蛹長等級對羽化率、雌性比及成蠅體長之影響：羽化率、雌性比及成蠅體長均與蛹長等級有關 (表 7)。羽化率以 I 級蛹最高 (90.7%)，其次為 II 級與 III 級蛹 (各為 76.8% 與 76.0%)，再次為 IV 級蛹 (61.8%)，V 級蛹最低 (14.5%)，其間 II 級與 III 級蛹長等級間羽化率雖無顯著差異，但與其他蛹長等級間呈顯著差異，另 I 級、IV 級及 V 級蛹長等級間羽化率亦呈顯著差異。雌性比亦以 I 級蛹最高 (0.95)，其次為 II 級蛹 (0.71)，再次為 III 級

表 5. 在不同葉寬之菜豆本葉上非洲菊斑潛蠅幼蟲密度對其葉內幼蟲死亡率與畸形蛹率之影響。

Table 5. Effect of *Liriomyza trifolii* larval density on the larval mortality in the leaf and abnormal pupae from different width grades of field bean primary leaves.

Grades of 3rd larval density (no. larvae leaf^{-1})^z	Mortality of larvae in leaf (%) Small leaf (width 6.0–7.0 cm)	Mortality of larvae in leaf (%) Middle leaf (width 7.1–8.0 cm)	Mortality of larvae in leaf (%) Large leaf (width 8.1–9.0 cm)	Abnormal of pupae (%) Small leaf (width 6.0–7.0 cm)	Abnormal of pupae (%) Middle leaf (width 7.1–8.0 cm)	Abnormal of pupae (%) Large leaf (width 8.1–9.0 cm)
0 (1–10)	0.0 ± 0.0 a^y	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 h	0.0 ± 0.0 h	0.0 ± 0.0 e
1 (11–15)	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 h	0.0 ± 0.0 h	0.0 ± 0.0 e
2 (16–20)	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a	1.2 ± 1.2 gh	0.5 ± 0.5 gh	0.0 ± 0.0 e
3 (21–25)	0.2 ± 0.2 a	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a	2.1 ± 0.7 efg	1.1 ± 0.1 fgh	0.8 ± 0.4 de
4 (26–30)	0.4 ± 0.2 a	0.5 ± 0.5 a	0.0 ± 0.0 a	1.8 ± 0.6 efg	1.3 ± 0.3 efg	1.4 ± 0.7 abcde
5 (31–35)	0.6 ± 0.3 a	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a	1.3 ± 0.4 fg	1.2 ± 0.2 efg	1.3 ± 0.9 abcde
6 (36–40)	0.0 ± 0.0 a	0.4 ± 0.2 a	0.0 ± 0.0 a	2.7 ± 1.0 defg	1.1 ± 0.2 efg	1.2 ± 0.8 bcde
7 (41–45)	1.1 ± 0.3 a	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a	3.1 ± 0.9 cdef	2.9 ± 0.3 cde	1.1 ± 0.3 abcde
8 (46–50)	0.7 ± 0.4 a	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a	3.7 ± 0.5 cdef	2.8 ± 0.7 cde	0.9 ± 0.5 cde
9 (51–55)	0.6 ± 0.4 a	0.6 ± 3.3 a	0.0 ± 0.0 a	4.3 ± 0.7 cde	1.7 ± 0.2 def	1.1 ± 0.7 bcde
10 (56–60)	0.6 ± 0.3 a	0.0 ± 0.0 a	0.0 ± 0.0 a	4.1 ± 1.8 cdef	3.2 ± 0.8 cde	1.3 ± 0.7 abcde
11 (61–65)	0.8 ± 0.5 a	1.0 ± 0.7 a	0.2 ± 0.4 a	3.5 ± 1.3 cdef	6.6 ± 2.2 ab	2.0 ± 1.3 abcde
12 (66–70)	1.0 ± 0.5 a	0.9 ± 0.6 a	0.3 ± 0.6 a	4.8 ± 0.9 bcde	6.5 ± 1.7 ab	2.0 ± 1.8 abcde
13 (71–75)	0.8 ± 0.5 a	0.5 ± 0.1 a	0.5 ± 0.2 a	6.8 ± 0.7 abc	4.5 ± 1.5 bc	3.8 ± 0.7 abc
14 (76–80)	0.6 ± 0.4 a	1.1 ± 0.7 a	0.1 ± 0.1 a	5.7 ± 0.6 abcd	3.9 ± 0.8 bcd	3.9 ± 0.8 ab
15 (81–85)	1.2 ± 1.2 a	1.8 ± 1.8 a	0.2 ± 0.3 a	7.1 ± 3.6 abc	10.1 ± 0.2 a	2.6 ± 1.7 abcd
16 (86–90)	1.1 ± 1.1 a	0.4 ± 0.4 a	0.4 ± 0.4 a	9.7 ± 1.8 a	8.7 ± 0.9 a	2.8 ± 0.7 abcd
17 (91–95)	1.0 ± 0.6 a	0.0 ± 0.0 a	0.5 ± 0.2 a	9.1 ± 0.4 ab	8.5 ± 1.8 a	4.2 ± 0.5 a

[z] Two–six leaves were sampled per replicate, three replicates per larval density grade.
[y] Mean ± standard error. Means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by LSD test. Percentage data were arcsin-square-root transformed prior to analysis.

與 IV 級蛹 (各爲 0.36 與 0.26)，V 級蛹最低 (0.11)，其間 III 級與 IV 級蛹長等級間雌性比雖無顯著差異，但與其他蛹長等級間呈顯著差異，另 I 級、II 級及 V 級蛹長等級間雌性比亦呈顯著差異。雌蠅與雄蠅之體長，均隨各蛹長等級之增加而漸短，蛹長等級爲 I、II、III、IV 及 V 級蛹時，雌蠅體長各爲 2.02、1.78、1.61、1.46 及 1.34 mm，雄蠅體長各爲 1.96、1.66、1.49、1.35 及 1.21 mm，不論雌蠅與雄蠅，各蛹長等級間成蠅體長均呈顯著差異。

蛹長等級對成蠅壽命、生育力、子代雌性比及取食刻點數之影響：由表 8 結果得知，在各蛹長等級中雌蠅與雄蠅壽命，均以 I 級與 II 級蛹最高 (雌蠅各爲 24.0 d 與 25.6 d，雄蠅均爲 16.4 d)，二處理間無顯著差異；其次爲 III 級與 IV 級蛹 (雌蠅各爲 15.7 d 與 17.2 d，雄蠅各爲 10.6 d 與 9.4 d)，二處理間雖無顯著差異，但皆與 I 級、II 級蛹間呈顯著差異。子代有活力卵數 (即第三齡幼蟲數)、蛹數及成蠅數，均以 I 級蛹最高 (各爲 567 粒卵、564 個蛹、411 隻成蠅)，其次爲 II 級蛹 (各爲 369 粒卵、362 個蛹、288 隻成蠅)，再次爲 III 級與 IV 級蛹 (各爲 237 粒卵與 234 粒卵、235 個蛹與 234 個蛹、185 隻成蠅與 186 隻成蠅)，顯示雌蠅生育力在 III 級與 IV 級蛹長等級間雖無顯著差異，但該二者皆與 I 級、II 級蛹長等級間呈顯著差異，且 I 級與 II 級蛹長等級間亦呈顯著差異。子代雌性比則與蛹長等級無關，均維持 0.52–0.54。雌蠅取食刻點數，以 I 級與 II 級蛹最多 (各爲 2,697 個與 2,586 個)，二者間無顯著差異；其次爲 III 級與 IV 級蛹 (各爲 1,596 個與 1,781 個)，取食刻點數在該二種

表 6. 非洲菊斑潛蠅蛹長等級對蛹長與蛹重之影響。

Table 6. Effect of pupal length grade on the pupal length and weight of *Liriomyza trifolii*.

Grade of pupal length[z]	Length (mm) of pupae		Weight (mg) of 50 pupae	
	n	Mean ± SEM	*n*	Mean ± SEM
I	30	1.93 ± 0.01 a[y]	9	28.6 ± 0.2 a
II	30	1.70 ± 0.04 b	13	22.1 ± 0.2 b
III	30	1.59 ± 0.01 c	12	17.8 ± 0.1 c
IV	30	1.36 ± 0.01 d	7	13.7 ± 0.3 d
V	30	1.17 ± 0.02 e	4	7.0 ± 0.3 e

[z] The pupal length is 1.85–2.11, 1.67–1.82, 1.49–1.63, 1.31–1.45, and 1.05–1.27 mm, for grades I, II, III, IV, and V, respectively.
[y] Mean ± standard error. Means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by LSD test.

表 7. 非洲菊斑潛蠅蛹長對羽化率、雌性比及成蠅體長之影響。

Table 7. Effect of pupal length grade on the emergence, female proportion, and adult length of *Liriomyza trifolii*.

Grade of pupal length[z]	Emergence (%)[y]		Female proportion[y]		Length (mm) of female adult		Length (mm) of male adult	
	n	Mean ± SEM	*n*	Mean ± SEM	*n*	Mean ± SEM	*n*	Mean ± SEM
I	5	90.7 ± 3.5 a[x]	5	0.95 ± 0.01 a	30	2.02 ± 0.01 a	2	1.96 ± 0.00 a
II	5	76.8 ± 3.4 b	5	0.71 ± 0.04 b	30	1.78 ± 0.01 b	30	1.66 ± 0.00 b
III	5	76.0 ± 3.9 b	5	0.36 ± 0.02 c	30	1.61 ± 0.01 c	30	1.49 ± 0.01 c
IV	5	61.8 ± 3.5 c	5	0.26 ± 0.03 c	27	1.46 ± 0.01 d	30	1.35 ± 0.01 d
V	5	14.5 ± 3.6 d	3	0.11 ± 0.11 d	4	1.34 ± 0.03 e	30	1.21 ± 0.01 e

[z] The pupal length is 1.85–2.11, 1.67–1.82, 1.49–1.63, 1.31–1.45, and 1.05–1.27 mm, for grades I, II, III, IV, and V, respectively.
[y] Fifty pupae per replicate kept at 25℃.
[x] Mean ± standard error. Means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by LSD test. Percentage data were arcsin-square-root transformed prior to analysis.

表 8. 非洲菊斑潛蠅蛹長對成蠅壽命、生育力、子代雌性比及取食刻點數之影響。

Table 8. Effect of pupal length grade on the longevity, fertility, female proportion, and feeding stipples of *Liriomyza trifolii*[z].

Grade of pupal length[y]	*n*	Longevity (d)		No. progeny produced/female				No. feeding stipples	Viable eggs/ feeding stipples
		Female	Male	Viable eggs[x]	Pupae	Adults	Female proportion		
I	9	24.0 ± 1.8 a[w]	16.4 ± 1.3 a	567 ± 44 a	564 ± 43 a	411 ± 33 a	0.53 ± 0.02 a	2,697 ± 202 a	0.22 ± 0.02 a
II	10	25.6 ± 2.5 a	16.4 ± 2.4 a	369 ± 35 b	362 ± 34 b	288 ± 31 b	0.52 ± 0.01 a	2,586 ± 241 a	0.15 ± 0.01 b
III	9	15.7 ± 1.6 b	10.6 ± 2.0 b	237 ± 21 c	235 ± 20 c	185 ± 14 c	0.52 ± 0.02 a	1,596 ± 157 b	0.15 ± 0.01 b
IV	5	17.2 ± 1.3 b	9.4 ± 0.9 b	234 ± 10 c	234 ± 10 c	186 ± 6 c	0.54 ± 0.01 a	1,781 ± 147 b	0.13 ± 0.01 b

[z] One pair of adults were provided daily with one seedling without mature leaves of field bean and honey, and reared at 25 ℃, 65–85% RH, and a photoperiod of 7 L : 17 D.
[y] The pupal length is 1.85–2.11, 1.67–1.82, 1.49–1.63, and 1.31–1.45 mm, for grades I, II, III, and IV, respectively.
[x] Number of eggs that survived to third instar.
[w] Mean ± standard error. Means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by LSD test.

蛹長等級間雖無顯著差異，但二者皆與 I 級、II 級蛹長等級間呈顯著差異。產有活力卵數與取食刻點數之比值，II 級、III 級及 IV 級蛹長等級時其值較低 (0.13–0.15)，各蛹長等級間無顯著差異，但均與 I 級蛹長等級 (0.22) 呈顯著差異。

成蠅密度對其日存活率、壽命及生育力之影響

日存活率：由圖 2 結果得知，斑潛蠅成蠅密度對雌蠅日存活率之影響大於雄蠅，其中又以成蠅密度為 3.0 對/株時，對雌蠅日存活率影響最巨。成蠅密度為 0.5、1.0、1.5、2.0 及 3.0 對/株時，雌蠅日存活率於第 2 日齡時均達 97.0–100%，於各第 6、6、5、9 及 5 日齡時均降為 77.0–81.1%，於各第 13、10、10、13 及 7 日齡時又降至 57.0–61.1%，於各第 16、14、12、15 及 9 日齡時更降至 47.2–53.0%。不論成蠅密度為 0.5、1.0、1.5、2.0 及 3.0 對/株時，雄蠅日存活率於第 2 至 3 日齡時均達 90.0–98.9%，第 4 至 5 日齡時均降為 70.0–72.2%，第 6 至 8 日齡時更降為 52.0–56.0%。

壽命：由表 9 結果得知，在長 75.0 cm、

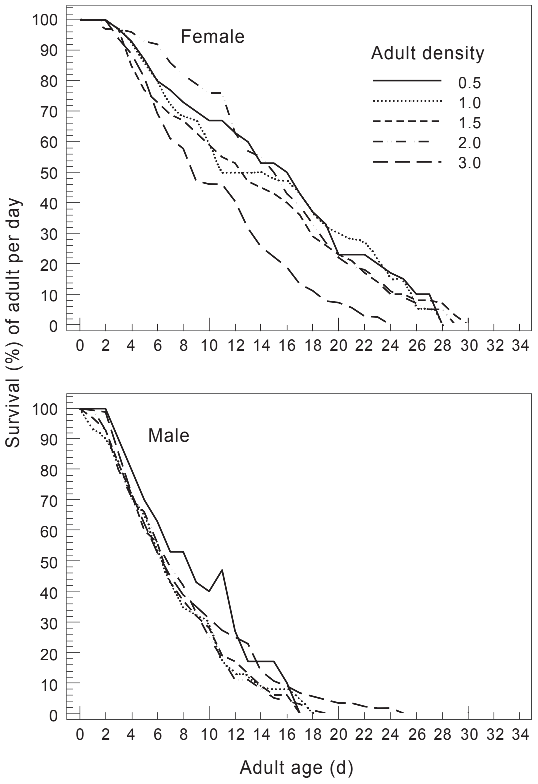

圖 2. 非洲菊斑潛蠅成蠅密度 (成蠅對數/20 株豆苗) 對成蠅日存活率之影響。

Fig. 2. Effect of adult densities (adult pairs/20 seedlings) on the daily survival of *Liriomyza trifolii*.

寬 55.0 cm、高 50.0 cm 之網箱內、每日定時供應一定比例之無真葉菜豆苗 (本葉寬 7.1–9.0 mm) 時，斑潛蠅在五種不同成蠅密度 (0.5、1.0、1.5、2.0 及 3.0 對/株) 下，雌蠅壽命在前四種處理時為 14.7–16.4 d，處理間無顯著差異，但其中除成蠅密度為 1.5 對/株 (14.7 d) 與 3.0 對/株 (11.4 d) 時，雌蠅壽命間無顯著差異外，其餘三種處理組雌蠅壽命，均顯著較成蠅密度為 3.0 對/株者長。雄蠅壽命在五種不同成蠅密度下為 8.3–10.3 d，各處理間無顯著差異。

生育力：雌蠅一生繁殖之總子代第三齡幼蟲數受成蠅密度影響，成蠅密度愈高其總子代第三齡幼蟲數愈多。當成蠅密度為 0.5、1.0、1.5、2.0 及 3.0 對/株時，10、20、30、40 及 60 對成蠅之總子代第三齡幼蟲數，各為 3,173、5,957、8,834、12,016 及 12,659 隻，其間成蠅密度為 2.0 對/株與 3.0 對/株時，二處理間無顯著差異，但與其他處理間均呈顯著差異，另成蠅密度為 0.5、1.0 及 1.5 對/株時，各處理間亦呈顯著差異 (表 9)。平均每雌一生繁殖之子代第三齡幼蟲數，在成蠅密度為 0.5、1.0、1.5 及 2.0 對/株時為 294–318 隻，處理間無顯著差異，但其值均顯著大於成蠅密度為 3.0 對/株者 (211 隻) (表 9)。

斑潛蠅雌蠅日產有活力總卵數、平均每雌日產有活力卵數、平均每葉日產有活力卵數，均與成蠅密度有關。雌蠅日產有活力總卵數方面，成蠅密度為 0.5、1.0、1.5、2.0 及 3.0 對/株時，該蠅產卵期近似各為 24、26、29、29 及 24 d；繁殖盛期之日齡亦相近，各為第 1–12、1–14、1–14、1–17 及 0–13 日齡；但繁殖盛期間各日齡雌蠅繁殖之有活力總卵數，卻隨成蠅密度增加而增多，各為 140–324、250–547、259–857、294–1,029 及 275–1,388 粒 (圖 3)。平均每雌日產有活力卵數方面，成蠅密度為 0.5、1.0、1.5、2.0 及 3.0 對/株時，繁殖盛期之日齡各為第 1–16、1–17、1–16、1–17 及 1–12 日齡；繁殖盛期間各日齡平均每雌繁殖之有活力卵數，各為 15.4–33.8、17.0–28.2、14.0–37.1、14.9–26.5 及 15.5–25.3 粒 (圖 4)，顯見當成蠅密度為 0.5、1.0 及 1.5 對/株時，各日齡平均每雌繁殖之有活力卵數相近，但成

表 9.　非洲菊斑潛蠅成蠅密度對其壽命與子代數之影響。

Table 9. Effect of adult density on the longevity and progeny number of *Liriomyza trifolii*[z].

Density of adult (no. adult pairs : no. seedlings)	Longevity (d)		Progeny	
	Female	Male	No. 3rd larvae/female	Total no. 3rd larvae
0.5 (10：20)	16.2 ± 0.7 a[y]	10.3 ± 0.5 a	318 ± 42 a	3,173 ± 416 d
1.0 (20：20)	15.9 ± 1.8 a	8.5 ± 1.1 a	298 ± 26 a	5,957 ± 518 c
1.5 (30：20)	14.7 ± 0.6 ab	8.3 ± 0.7 a	294 ± 14 a	8,834 ± 437 b
2.0 (40：20)	16.4 ± 1.0 a	9.5 ± 1.3 a	300 ± 14 a	12,016 ± 583 a
3.0 (60：20)	11.4 ± 1.1 b	9.9 ± 0.4 a	211 ± 11 b	12,659 ± 649 a

[z] Experiment was conducted in a screen cage (75.0 by 55.0 by 50.0 cm, 92 meshes).
[y] Mean ± standard error (n = 3). Means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by LSD test.

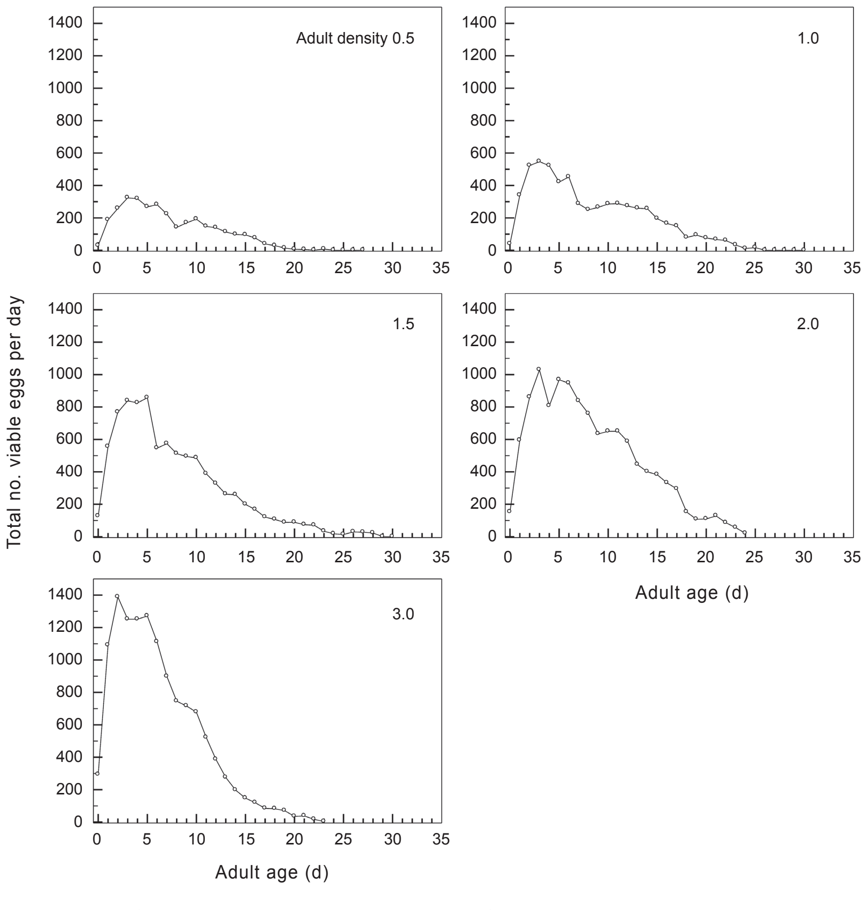

圖 3.　非洲菊斑潛蠅成蠅密度 (成蠅對數/20 株豆苗) 對日產有活力總卵數之影響。

Fig. 3.　Effect of adult densities (adult pairs/20 seedlings) on the total number of viable eggs per day in *Liriomyza trifolii*.

蠅密度爲 2.0 對/株與 3.0 對/株時，該值即隨成蠅密度之增加而減少。平均每葉雌蠅日產有活力卵數方面，成蠅密度爲 0.5、1.0、1.5、2.0 及 3.0 對/株時，繁殖盛期之日齡各爲第 1–14、1–17、1–14、2–17 及 1–19 日齡；繁殖盛期間各日齡平均每葉上繁殖之有活力卵數隨成蠅

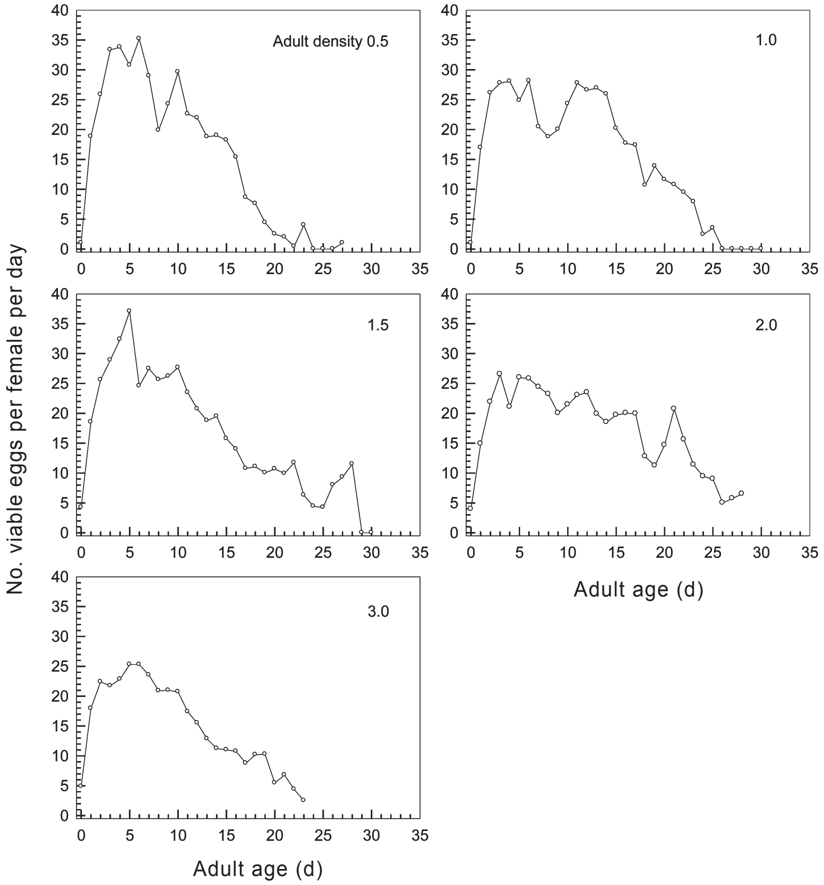

圖 4. 非洲菊斑潛蠅成蠅密度 (成蠅對數/20 株豆苗) 對每雌日產有活力卵數之影響。

Fig. 4. Effect of adult densities (adult pairs/20 seedlings) on the number of viable eggs per female per day in *Liriomyza trifolii*.

密度增加而增多，各爲 4.7–8.8、8.9–14.3、13.4–26.5、18.8–26.6 及 14.7–38.5 粒 (圖 5)。

討論

非洲菊斑潛蠅於 1988 年 2 月首次發現入侵危害台中市大坑地區之非洲菊後，隨即擴散至中部地區危害菊科花卉與豆科蔬菜 (Wang 1988; Wang & Lin 1988)。筆者等爲進行非洲菊斑潛蠅之生物防治與藥劑防治研究，於 1993 年起開始研究該蠅繁殖時之種內競爭，希冀建立適當繁殖方法供試驗用。本文雖延至今發表，但有關試驗結果除早已應用在非洲菊斑潛蠅及其寄生蜂之研究，如非洲菊斑潛蠅之形態與生活史及繁殖力、寄生蜂對寄主齡期之偏好性、寄生蜂之外形與生活史、寄生蜂之種內競爭、溫度對寄生蜂抑制寄主能力之影響、寄生蜂之貯存與調節產卵能力、藥劑對斑潛蠅防治、及藥劑對寄生蜂影響等研究報告中 (Chien & Ku 1996, 2001a, 2001b, 2001c, 2002; Chien *et al*. 2004, 2005a, 2005b, 2005c, 2007a, 2007b)，更擴及蔬菜斑潛蠅 (*Liriomyza sativae* Blanchard) 與南美斑潛蠅 [(*Liriomyza huidobrensis* (Blanchard)] 及其寄生蜂等之研究。

昆蟲繁殖時寄主植物種類與其生長期之選擇非常重要，除需考慮昆蟲對寄主植物種類與生長期之偏好性外，寄主植物栽培期短、易操作管理及價廉等亦爲考慮因素。Parrella *et al*. (1983) 測試非洲菊斑潛蠅在菊花、芹菜及番茄

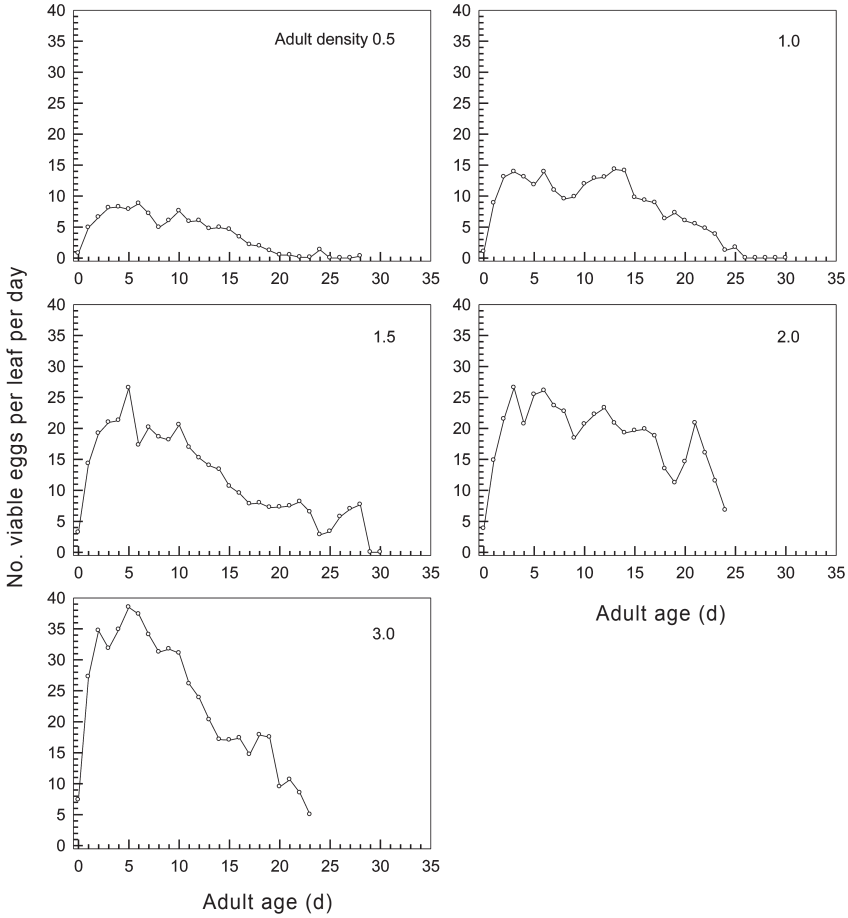

圖 5. 非洲菊斑潛蠅成蠅密度 (成蠅對數/20 株豆苗) 對每葉日產有活力卵數之影響。

Fig. 5. Effect of adult densities (adult pairs/20 seedlings) on the number of viable eggs per leaf per day in *Liriomyza trifolii*.

上之生物性，得知菊花與芹菜顯著較番茄適合該蠅之繁殖，其產有活力卵數與取食刻點數之比值，在前二種寄主植物上各為 0.25 與 0.24，後者僅為 0.10。非洲菊斑潛蠅在台灣雖偏好危害菊科花卉 (unpublished data)，但 Rathman *et al*. (1991) 利用矮生萊豆苗栽種時，因生長期短 (14–15 d)、空間需求小及僅需澆水不必施肥等較菊花更為優勢的特性，成功繁殖非洲菊斑潛蠅及其釉癭小蜂。本試驗以菜豆苗做為繁殖非洲菊斑潛蠅之寄主植物，而非採用矮生萊豆，其因除菜豆苗具有前述矮生萊豆栽種時之優勢特性外，也因種子可在商店方便購得，每公斤 67 元，而矮生萊豆卻多為農家自行留種自食，鮮有市售。非洲菊斑潛蠅在田間雖可在菜豆成株之真葉上產卵、取食，但 Chien & Ku (1996) 證實該蠅在菜豆苗之本葉與真葉間，對本葉具有極顯著之產卵與取食偏好性，尤其完全不產卵於真葉上，因而本試驗採用菜豆苗之本葉為試驗材料，另對該篇研究報告中，將本葉誤植為真葉、真葉誤植為複葉提出更正。

同種間之競爭有二種主要型式。共滅型競爭 (scramble-type competition) 或稱利用型競爭 (exploitation-type competition) 或稱飢餓競爭 (starvation competition)，係發生於多數個體共同利用一個有限資源而非彼此攻擊狀態下 (Nicholson 1954; Birch 1957; Miller 1967)；干擾型競爭 (interference-type competition)

則發生於個體間之比賽型競爭 (contest-type competition) 或稱同類相殘 (cannibalism) 現象，一方限制他方接近其必需之資源狀態下 (Nicholson 1954; Price 1997)，以致競爭極致時，贏者得到其生存與繁殖所需之所有物質，而輸者則無。當資源短缺時，種內競爭經由前述二機制調節動物族群，並已在實驗室內被證實 (Nicholson 1954; Klomp 1964; Peters & Barbosa 1977; Polis 1981)。寬額斑潛蠅 [*Liriomyza frontella* (Malloch)] 與蔬菜斑潛蠅同齡幼蟲各自競爭時，二種斑潛蠅其利用型競爭，均發生於較高密度之第三齡幼蟲，此時幼蟲相遇不但會自動轉向、且幼蟲之爲害已移至葉片之海綿葉肉層 (spongy mesophyll) 與葉柄，致使蔬菜斑潛蠅幼蟲在相同葉片與幼蟲密度下，因所獲營養之不同，幼蟲重量會有 18% 之變異；而二種斑潛蠅其干擾型競爭，則發生於第一齡或二齡幼蟲爲害葉片柵狀葉肉層 (palisade mesophyll) 時，若第一齡幼蟲在狹窄隧道中相遇，因受限隧道寬度無法轉身防禦，以致位處於後方之幼蟲，即輕易地以口器刺破其前方幼蟲之表皮，吸取其體液並留下其乾縮之個體，若第二齡幼蟲在較寬隧道中相遇，幼蟲可轉身防禦以致雙方勝負難辨，縱使贏者亦可能因受傷而隨後身亡；另幼蟲密度低時，幼蟲之干擾競爭與密度無依變關係 (Quiring & McNeil 1984a; Petitt & Wietlisbach 1992)。本試驗因著重於非洲菊斑潛蠅同齡幼蟲密度，對該蠅及其寄生蜂繁殖之影響，因此爲計數幼蟲之方便與準確性，僅觀察第三齡幼蟲時之競爭，發現此時其種內競爭之型式亦屬利用型，競爭結果與前述二種斑潛蠅相似，葉內幼蟲死亡率均低，不受菜豆苗本葉葉寬與幼蟲密度影響，與對照組無顯著差異；但在小型葉上當第三齡幼蟲密度等級爲 3 級以上 (> 21 隻/葉)、中型葉上第三齡幼蟲密度等級爲 4 級以上 (> 26 隻/葉)、及大型葉上第三齡幼蟲密度等級爲 13 級以上 (> 71 隻/葉) 時，幼蟲因營養不足，畸形蛹率顯著增加。同時在相同葉寬等級與不同幼蟲密度等級下，蛹長亦會有不同等級之變異。至於非洲菊斑潛蠅第一齡或二齡幼蟲種內競爭之型式，則未以照相方式進行探討。

昆蟲繁殖時幼蟲密度爲一重要因子，幼蟲密度高時常導致幼蟲間之競爭，除直接降低其存活率與蛹體大小外，亦間接影響羽化率、雌性比、成蟲體長、壽命及生殖力。寬額斑潛蠅幼蟲在苜蓿上，第一齡幼蟲之存活率與幼蟲密度呈依變關係，且隨幼蟲密度之增加，蛹死亡率增加、蛹重減少，但蛹之發育速率、成蟲性比均與幼蟲密度無關 (Quiring & McNeil 1984a)，另該蠅之壽命與生殖力亦受蛹重影響 (Quiring & McNeil 1984b)。Petitt & Wietlisbach (1992) 發現蔬菜斑潛蠅在萊豆本葉上，第一齡幼蟲密度與其存活率、幼蟲重量及蛹存活率有關。第一齡幼蟲密度小於 1.0 隻 cm^{-2} 時，存活率高達 90% 以上，但幼蟲密度增加時其存活率顯著降低；第一齡幼蟲密度爲 0.1–2.9 隻 cm^{-2} 時，隨幼蟲密度之增加，第三齡幼蟲鑽出葉片後之體重顯著減少，當第一齡幼蟲密度爲 2.8 隻 cm^{-2} 時，其第三齡幼蟲之體重較第一齡幼蟲密度爲 0.3 隻 cm^{-2} 者減少 37%；蛹存活率亦隨幼蟲密度增加而顯著減少。Parrella (1983) 測知在菊花植株上最多祇能承受約 30 隻非洲菊斑潛蠅幼蟲之危害，超過此限即有種內競爭之發生。當每株幼蟲數爲 28.7 隻時，幼蟲存活率高達 76.0–100% 等級，但每株幼蟲數各爲 94.0、64.3 及 53.9 隻時，幼蟲存活率即顯著各降爲 0.0–25.0、26.0–50.0 及 51.0–75.0% 等級；同時在幼蟲存活率較高之等級中，蛹體大者所占比例較多，當幼蟲存活率各爲 0.0–25.0、26.0–50.0、51.0–75.0 及 76.0–100% 等級時，蛹長大於或等於 1.8 mm 者各占 29.0、51.0、58.0 及 71.0%；另自大蛹 (蛹長 1.8–2.1 mm) 與小蛹 (蛹長 1.4–1.6 mm) 羽化之成蠅，每雌蠅產下有活力卵數 (各爲 360.9 粒與 95.8 粒)、取食刻點數 (各爲 2,215.7 個與 860.3 個) 及壽命 (各爲 22.6 d 與 13.2 d) 等均呈極顯著差異，但雄蠅壽命卻不受影響。本文證實菜豆苗本葉葉寬與非洲菊斑潛蠅第三齡幼蟲密度，均對幼蟲存活率與蛹長有顯著影響，同時亦間接影響該蠅羽化率、雌性比、成蟲體長、壽命及生育力。在中型葉與大型葉上，雖較小型葉能承受較高幼蟲密度之取食，但在中型葉上當第三齡幼蟲密度等級爲 1–3

級、或在大型葉上第三齡幼蟲密度等級為 1–7 級時，二者蛹長等級為 I 級與 II 級合計者 (蛹長 1.67–2.11 mm) 之分布機率，雖與其對照組間呈顯著差異，但處理間卻無顯著差異。另蛹長與蛹重均隨蛹長等級之增加而漸減，因而在 I 級與 II 級蛹長等級時，不論二者之雌性比、雌蠅與雄蠅體長、成蠅壽命、取食刻點數、子代有活力卵數及子代成蠅數等，均與其他蛹長等級間呈顯著差異；羽化率方面，以 I 級蛹最高、II 級與 III 級蛹其次、IV 級蛹再次、V 級蛹最低。顯示在菜豆苗本葉中型葉上，當非洲菊斑潛蠅第三齡幼蟲密度等級為 1–3 級 (11–25 隻/葉)、或在大型葉上第三齡幼蟲密度等級為 1–7 級 (11–45 隻/葉) 時，均可減少其幼蟲間之種內競爭及其後對蛹與成蠅之影響。

昆蟲繁殖時成蟲密度亦為一重要因子，成蟲密度高時雖可增加子代數量，但也常導致成蟲間之競爭，降低壽命與生殖力。Parrella (1983) 測試每株菊花上各引入 2、4 及 6 隻非洲菊斑潛蠅雌蠅時，幼蟲存活率達 76.0–100% 等級者，各占 43、30 及 21%，顯示僅 2 隻雌蠅處理組種內競爭最小，幼蟲存活率顯著較其他二組為高。本文證實在菜豆苗本葉中型至大型葉上，當非洲菊斑潛蠅成蠅密度為 2.0 對/株 (40 對成蠅：20 株豆苗) 時，成蠅間無種內競爭，此成蠅密度下雌蠅壽命 (16.4 d)、雄蠅壽命 (9.5 d) 及平均每雌一生繁殖之子代第三齡幼蟲數 (300 隻)，均與成蠅密度為 0.5、1.0 及 1.5 對/株時無顯著差異。但成蠅密度為 2.0 對/株時，其 40 對成蠅一生繁殖之總子代第三齡幼蟲數 (12,016 隻) 卻顯著較成蠅密度為 0.5、1.0 及 1.5 對/株，即各 10、20、30 對成蠅時，各多 2.8、1.0 及 0.4 倍；同時成蠅密度為 2.0 對/株時，雌蠅繁殖盛期間 (2–17 日齡) 各日齡平均每葉上繁殖之有活力卵數 (第三齡幼蟲數) 為 18.8–26.6 粒，亦較成蠅密度為 0.5、1.0 及 1.5 對/株時多。但當成蠅密度為 3.0 對/株 (60 對成蠅：20 株豆苗) 時，成蠅間即有競爭，此時其繁殖盛期間 (1–19 日齡) 各日齡平均每葉上繁殖之有活力卵數雖達 14.7–38.5 粒，但雌蠅壽命 (11.4 d) 與平均每雌一生繁殖之子代第三齡幼蟲數 (211 隻) 均顯著較成蠅密度為 2.0 對/株時低。

綜合上述有關非洲菊斑潛蠅幼蟲密度在菜豆本葉不同葉寬時之種內競爭、成蠅密度在菜豆本葉中型至大型葉時之種內競爭、繁殖該蠅之經驗 (Chien & Ku 1996) 及寄生蜂產卵方式 (Chien & Ku 2001b, 2001c) 等資料，總結當繁殖非洲菊斑潛蠅時，為顧及該蠅交尾與產卵習性、雌蠅壽命、每雌產子代數、平均每葉產有活力卵數、每日定量產出之總有活力卵數、寄生蜂非共育寄生性 (idiobiont)、菜豆苗之經濟利用及人力之節省等，筆者等建議可於 25℃ 下在長 75.0 cm、寬 55.0 cm、高 50.0 cm 繁殖網箱內，以略高於成蠅密度 2.0 對/株之比例，除首日將 30 株無真葉菜豆苗 (本葉寬 7.1–9.0 cm) 供第 2 日齡已交尾之 80 隻雌蠅產卵 7 h 外，次日後每日早上尚需持續補充 20 隻第 2 日齡已交尾之雌蠅，以維持繁殖網箱內定量之總雌蠅數。經 6 d 後，可選擇豆苗本葉上第三齡幼蟲密度 15–20 隻者，供非洲菊斑潛蠅繼代繁殖；20–30 隻者，則供該蠅二種幼蟲寄生蜂-異角釉小蜂 [*Hemiptarsenus varicornis* (Girault)] 與華釉小蜂 [*Neochrysocharis formosa* (Westwood)] 之繁殖。

引用文獻

Birch, L. C. 1957. The meanings of competition. Amer. Nat. 91:5–18.

Chien, C. C. and S. C. Ku. 1996. Morphology, life history and reproductive ability of *Liriomyza trifolii*. J. Agric. Res. China 45:69–88. (in Chinese with English abstract)

Chien, C. C. and S. C. Ku. 2001a. Instar preference of five species of parasitoids of *Liriomyza trifolii* (Hymenoptera: Eulophidae, Braconidae). Formosan Entomol. 21:89–97. (in Chinese with English abstract)

Chien, C. C. and S. C. Ku. 2001b. Appearance and life history of *Hemiptarsenus varicornis* (Hymenoptera: Eulophidae). Formosan Entomol. 21:247–255. (in Chinese with English abstract)

Chien, C. C. and S. C. Ku. 2001c. Appearance and life history of *Neochrysocharis formosa* (Hymenoptera: Eulophidae). Formosan Entomol. 21:383–393. (in Chinese with English abstract)

Chien, C. C. and S. C. Ku. 2002. Intraspecific competition of two species of parasitoids (Hymenoptera:

Eulophidae) of *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae). Formosan Entomol. 22:279–290. (in Chinese with English abstract)

Chien, C. C., S. C. Chang, and S. C. Ku. 2004. Influence of temperature on both population increase and host-killing capability of *Hemiptarsenus varicornis* (Hymenoptera: Eulophidae). Formosan Entomol. 24:91–105. (in Chinese with English abstract)

Chien, C. C., S. C. Ku, and S. C. Chang. 2005a. Influence of temperature on the population increase and host-killing capability of *Neochrysocharis formosa* (Hymenoptera: Eulophidae). Plant Prot. Bull. 47:87–101. (in Chinese with English abstract)

Chien, C. C., S. C. Ku, and S. C. Chang. 2005b. Study of the storage and oviposition-regulating capability of *Hemiptarsenus varicornis* (Hymenoptera: Eulophidae). Formosan Entomol. 25:9–21. (in Chinese with English abstract)

Chien, C. C., S. C. Ku, and S. C. Chang. 2005c. Study of the storage and oviposition-regulating capability of *Neochrysocharis formosa* (Hymenoptera: Eulophidae). Plant Prot. Bull. 47:213–227. (in Chinese with English abstract)

Chien, C. C., S. C. Ku, and S. C. Chang. 2007a. The effect of common insecticides on *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae). Formosan Entomol. 27:195–205. (in Chinese with English abstract)

Chien, C. C., S. C. Ku, and S. C. Chang. 2007b. The effect of common insecticides on two parasitoids (Hymenoptera: Eulophidae) of *Liriomyza trifolii* (Burgess) (Diptera: Agromyzidae). Formosan Entomol. 27:277–292. (in Chinese with English abstract)

Klomp, H. 1964. Intraspecific competition and the regulation of insect numbers. Annu. Rev. Entomol. 9:17–40.

Lindquist, R. K. 1983. New greenhouse pests, with particular reference to the leafminer, *Liriomyza trifolii*. p.1087–1094. *in*: Proceeding of 10th International Congress Plant Protection. November 20–25, 1983. Brighton. England. Br. Crop Prot. Counc., Croydon.

Miller, R. S. 1967. Pattern and process in competition. Adv. Ecol. Res. 4:1–74.

Minkenberg, O. P. J. M. and J. C. van Lenteren. 1986. The Leafminer *Liriomyza bryoniae* and *L. trifolii* (Diptera: Agromyzidae), their Parasites and Host Plant: A Review. Agric. Univ. Wangeningen. Wageningen. 50 pp.

Nicholson, A. J. 1954. An outline of the dynamics of animal populations. Aust. J. Zool. 2:9–65.

Parrella, M. P. 1983. Intraspecific competition among larvae of *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae): Effects on colony production. Environ. Entomol. 12:1412–1414.

Parrella, M. P., K. L. Robb, and J. Bethke. 1983. Influence of selected host plants on the biology of *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae). Ann. Entomol. Soc. Amer. 76:112–115.

Peters, M. T. and P. Barbosa. 1977. Influence of population density on size, fecundity, and developmental rate of insects in culture. Annu. Rev. Entomol. 22:431–450.

Petitt, F. L. and D. O. Wietlisbach. 1992. Intraspecific competition among same-aged larvae of *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae) in lima bean primary leaves. Environ. Entomol. 21:136–140.

Polis, G. A. 1981. The evolution and dynamics of intraspecific predation. Annu. Rev. Ecol. Syst. 12:225–251.

Price, P. W. 1997. Insect Ecology. John Wiley and Sons. New York. 888 pp.

Quiring, D. T. and J. N. McNeil. 1984a. Exploitation and interference intraspecific larval competition in the dipteran leaf miner, *Agromyza frontella* (Rondani). Can. J. Zool. 62:421–427.

Quiring, D. T. and J. N. McNeil. 1984b. Influence of intraspecific larval competition and mating on the longevity and reproductive performance of females of the leaf miner *Agromyza frontella* (Rondani) (Diptera: Agromyzidae). Can. J. Zool. 62:2197–2200.

Rathman, R. J., M. W. Johnson, and B. E. Tabashnik. 1991. Production of *Ganaspidium utilis* (Hymenoptera: Eucoilidae) for biological control of *Liriomyza* spp. (Diptera: Agromyzidae). Biol. Control 1:256–260.

Wang, C. L. 1988. The newly invaded insect pests on horticultural crops in Taiwan. Chinese J. Entomol. Spec. Publ. 2:145–153. (in Chinese with English abstract)

Wang, C. L. and F. C. Lin. 1988. A newly invaded insect pest *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) in Taiwan. J. Agric. Res. China 37:453–457.

Intraspecific Competition among Same-aged Larvae and Adults of *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) in Field Bean Primary Leaves: Effects on Colony Production

Ching-Chin Chien[1,*], Hsiu-Chih Ku[2], and Shu-Chen Chang[3]

Abstract

Chien, C. C., H. C. Ku, and S. C. Chang. 2013. Intraspecific competition among same-aged larvae and adults of *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) in field bean primary leaves: effects on colony production. J. Taiwan Agric. Res. 62(3):209–224.

The agromyzid leafminer, *Liriomyza trifolii* (Burgess), is a major pest of vegetables and ornamentals throughout the world. For its biological and chemical control studies, the suitable rearing methods of this leafminer must be established. This study investigated the intraspecific competition among same-aged larvae and adults in three width grades of field bean primary leaves (*Phaseolus vulgaris* var. *communis* Aeschers) for providing better production methods of this leafminer and its parasitoids. The experiments were conducted at 25℃ under three grades of primary leaf width, i.e., the small, middle, and large leaf width was 6.0–7.0, 7.1–8.0, and 8.1–9.0 cm, respectively. In 17 larval densities, 11–95 third-instar larvae were divided into 17 grades at intervals of 5 larvae, the control treatment being 0 grade including 1–10 larvae, while, in 5 adult densities, numbers of pairs of adults in proportion to numbers of seedlings conducted in laboratory were 10：20, 20：20, 30：20, 40：20, and 60：20, respectively. The results showed that the larval survival and pupal length grades of *L. trifolii* were directly affected by grades of primary leaf width and leafminer larval density, the pupal length of I, II, III, IV, and V grades being 1.85–2.11, 1.67–1.82, 1.49–1.63, 1.31–1.45, and 1.05–1.27 mm, respectively. Exploitative competition occurred among third-instar larvae. The emergence of pupa, size of adult, female proportion, longevity, fertility and number of feeding stipples were all indirectly affected by grades of primary leaf width and leafminer larval density through leafminer pupal length. The longevity and fertility of this female leafminer were also affected by the adult density. This study indicates that the suitable rearing methods of *Liriomyza trifolii* are as follows: 30 seedlings without mature leaves of field bean in which 10- and 11-d-old, primary leaf width was 7.1–9.0 cm are placed in a screen cage (75 by 55 by 50 cm, 92 meshes) containing 80 2-d-old and mated females that are allowed to oviposit for 7 h at 25℃, but another 20 females are added daily to maintain the uniform number of females. After 6 days, when eggs develop to third-instar larvae, 15–20 larvae/leaf are suggested to provide for the successive production of this leafminer, and 20–30 larvae/leaf are for its larval parasitoids, *Hemiptarsenus varicornis* (Girault) and *Neochrysocharis formosa* (Westwood), respectively.

Key words: *Liriomyza trifolii*, Intraspecific competition, Production, Field bean.

Received: February 25, 2013; Accepted: May 21, 2013.
* Corresponding author, e-mail: chien@tari.gov.tw
1 Former Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
2 Research Assistant, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
3 Assistant Research Fellow, Applied Zoology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 62(3):225–234 (2013)
DOI: 10.6156/JTAR/2013.06203.03

紅龍果莖潰瘍病之病原特性及防治藥劑篩選

倪蕙芳[1]　黃巧雯[2]　許淑麗[3]　賴素玉[3]　楊宏仁[4,*]

摘要

倪蕙芳、黃巧雯、許淑麗、賴素玉、楊宏仁。2013。紅龍果莖潰瘍病之病原特性及防治藥劑篩選。台灣農業研究 62(3):225–234。

紅龍果莖潰瘍病 (pitaya stem canker) 為近年來紅龍果之重要病害，限制紅龍果的生產。於田間接種莖潰瘍病菌 *Neoscytalidium dimidiatum* 分生胞子於紅龍果植株莖蔓上，結果顯示不論是否進行傷口接種，紅龍果肉質莖均會於接種後 2 wk 顯現初期潰瘍病徵；傷口接種後 6 wk，病斑上開始產生黑色之柄胞子堆，部份病斑會急速擴展，至接種後 12 wk 病斑組織穿孔掉落，18 wk 以後病斑持續向外擴展造成莖節腐爛。25–35℃為本病原菌絲生長之最適溫，而 25–40℃為分生胞子之發芽適溫。測試殺菌劑對本菌之菌絲生長及分生胞子發芽影響，結果發現賽普護汰寧、亞托待克利及得克利等藥劑處理皆可有效抑制菌絲在含藥 PDA 培養基上之生長，而在免得爛、三氟敏、百克敏、亞托敏、亞托待克利及克熱淨等藥劑稀釋溶液處理下則可顯著降低病原菌之胞子發芽率。以上藥劑為目前推薦為紅龍果炭疽病之防治藥劑，於田間防治時可以併用作為防治紅龍果莖潰瘍病之用。

關鍵詞：紅龍果、莖潰瘍病、紅龍果莖潰瘍病菌、藥劑篩選。

前言

紅龍果 (*Hylocereus* spp.) 又名火龍果、龍珠果、仙蜜果或半攀性仙人掌，於 2008 年經果樹品種審議委員會正式統一定名為紅龍果。其屬於三角柱屬 (*Hylocereus*) 之多年生攀緣性多肉植物，為台灣近年來的新興果樹之一，常見的品種依果肉顏色分為白肉種 (*Hylocereus undatus* Britt. & Rose)、紅肉種 (*Hylocereus polyrhizus* Britt. & Rose) 及紫肉種 (*Hylocereus costaricensis* Britt. & Rose) (Yen 2005; Liou 2010)。本作物原產於南墨西哥、太平洋週邊之中美洲諸國；現今於熱帶美洲、西印度群島、美國南佛羅里達州及熱帶地區均有分布與栽培 (Yen 2005)。台灣於 1645 年引進栽培，目前栽培面積已超過 1,000 ha，每公頃年產量高達 15 Mg 以上，中南部地區為主要產區 (Liou 2010; Yen 2005)。

國外有關引起紅龍果之病害病原記錄有 *Alternaria* sp.、*Ascochyta* sp.、*Aspergillus* sp.、*Bipolaris cactivora*、*Botryosphaeria dothidea*、*Capnodium* sp.、*Colletotrichum gloeosporioides*、*Dothiorella* sp.、*Fusarium* sp.、*Gleoeosporum agares*、*Macssonnina agaves*、*Phytophthora* sp. 及 *Sphaceloma* sp. (Elshafie & Ba-Omar 2001; Valencia-Botin *et al*. 2003; Palmateer & Ploetz 2006; Palmateer *et al*. 2007; Taba *et al*. 2007; Sijam *et al*. 2008)。在台灣則有由 *Fusarium oxysporum* 及 *Fusarium subglutinans* 混合或單獨造成之紅龍果莖腐病 (Tsai 2004)，由 *Colletotrichum gloeosporioides* 引起的炭疽病 (Liou 2010)，由 *Cactus virus X* 引起仙人掌 X 病毒病 (Liou *et al*. 2004) 及由 *Bipolaris cactivora* 引起之紅龍果果腐病 (Wang & Lin 2005) 等危害紅龍果之

投稿日期：2013 年 3 月 19 日；接受日期：2013 年 6 月 14 日。
* 通訊作者：caes@dns.caes.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所嘉義試驗分所植物保護系副研究員兼系主任。台灣 嘉義市。
[2] 農委會農業試驗所嘉義試驗分所植物保護系助理研究員。台灣 嘉義市。
[3] 農委會農業試驗所嘉義試驗分所植物保護系研究助理。台灣 嘉義市。
[4] 農委會農業試驗所嘉義試驗分所研究員兼分所長。台灣 嘉義市。

記錄。而在 2012 年農委會農業試驗所由嘉義農業試驗分所發表一種在其莖部初爲小黃點，後漸擴展爲橘色及褐色斑並產生突起之柄子器，嚴重時會導致莖部腐爛之病徵，果實亦有類似病徵，經病原分離後，發現爲由 *Neoscytalidium dimidiatum* (Penz.) Crous & Slippers (Chuang *et al*. 2012) 引起之病害，並定名爲紅龍果莖潰瘍病 (Pitaya stem canker)。

Neoscytalidium 爲子囊菌葡萄座腔菌科 (Botryosphaeriaecae) 真菌內之一屬，其特徵爲具有粉狀氣生菌絲體、產生成串圓柱形、鈍橢圓到甕形、深褐色、厚壁、0 至 2 個隔膜的節生胞子，而 *Neoscytalidium dimidiatum* 爲本屬之模式種 (Type species) (Crous *et al*. 2006)。*N. dimidiatum* 爲一廣泛分佈於自然界且其寄主種類繁多之真菌，其有記載之寄主種類有合歡 (*Albizia lebbeck*)、鳳凰木 (*Delonix regia*)、無花果 (*Ficus carica*)、柑桔 (*Citrus*)、檬果 (*Mangifera indica*) (Elshafie & Ba-Omar 2001; Polizzi *et al*. 2009; Ray *et al*. 2010) 及紅龍果 (Chuang *et al*. 2012; Lan *et al*. 2012) 等，其所造成之病徵有梢枯、流膠及潰瘍等。目前雖已知本菌爲引起紅龍果莖潰瘍病及褐斑病之病原菌 (Chuang *et al*. 2012; Lan *et al*. 2012)，然其在田間之病徵極具多樣性，因此本研究擬將 *N. dimidiatum* 田間感染紅龍果莖之病勢進展進行觀察記錄並進行病原菌生理特性試驗。此外，由於本病害目前並無正式推薦藥劑供農友防治參考，因此本研究亦一併就目前已推薦在防治紅龍果炭疽病之藥劑進行防治藥劑篩選，期望藉此可以篩選出有效藥劑於防治炭疽病時一併進行莖潰瘍病之防治，增加收益。

材料與方法

供試菌株之分離、培養及保存

將罹患莖潰瘍病之紅龍果莖蔓上病斑之病健部組織，置於以乳酸 (lactic acid) 酸化之 APDA 培養基 (pH 3.8) 進行組織分離，APDA 之配製方法爲以 750 μL 50% (v/v) 乳酸溶液加入 300 mL 高壓滅菌後降至 60℃ 之 potato dextrose agar (PDA, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)。其分離所得之菌株置於 PDA 中純化後，再將其培養於含滅菌木麻黃針葉之 2% 水瓊脂 (water agar; WA) 平板上，待其產胞後進行單胞分離，並將其保存於 PDA 斜面培養基及無菌水保存管中。

病原菌接種在紅龍果莖部之病勢進展

將由紅龍果莖潰瘍病組織分離之 *N. dimiditatum* Nd-23 及 Nd-55 分離株分別培養於含木麻黃葉之水瓊脂培養基平板上，3 wk 後以無菌水將木麻黃葉上所產生之分生胞子洗下，並製成胞子懸浮液 (100 spores μL^{-1}) 備用。於嘉義農業試驗分所試驗田種植之紅龍果植株之肉質莖，選取莖節後先以 75% 酒精表面消毒，再以無菌之針頭在欲接種處上針刺製造傷口。於上述已針刺製造傷口之莖節進行接種，每個接種點滴含有 100 個胞子之胞子懸浮液，再滴上已降溫但尚未凝固之 2% WA (water agar) 保濕，繼而以透明大塑膠袋套上莖節保濕 2 d 後去除塑膠袋，接種後每週調查病勢進展情形。除上述傷口接種外，另配製 Nd-55 胞子懸浮液 (105 spores μL^{-1}) 直接噴佈於未人工製造傷口之紅龍果莖節，如上述套袋保濕後，觀察記錄病徵發展情形。

溫度對 *N. dimiditatum* 菌絲生長之影響

將 *N. dimiditatum* 菌株 Nd-23 及 Nd-55 菌株，於 PDA 培養基室溫培養 2 d 後以直徑 0.5 cm 滅菌過之打孔器切取菌絲邊緣，置於 PDA 平板中央，分別置於 10℃、15℃、20℃、25℃、30℃、35℃ 及 40℃ 之定溫箱中黑暗培養，於培養後第 1 天及第 2 天測量其菌絲生長之直徑，每個處理 5 重複，本實驗重複進行 2 次。

殺菌劑對 *N. dimiditatum* 菌絲生長之影響

將供試菌株 Nd-23 及 Nd-55 移植至 PDA 培養基，室溫培養 2 d 後，以滅菌過之打孔器 (孔徑 0.5 cm) 切取菌絲塊供試，並利用藥劑平板測試法測定供試藥劑之抑菌效果。先將已推薦於紅龍果炭疽病防治使用藥劑 62.5% 賽普護汰寧水分散性粒劑 (Cyprodinil + Fludioxo-

nil，先正達股份有限公司)、80% 免得爛水分散性粒劑 (Metiram，巴斯夫股份有限公司)、50% 三氟敏水分散性粒劑 (Trifloxystrobin，拜耳股份有限公司)、40% 克熱淨可濕性粉劑 (Iminoctadine，日本曹達株式會社)、70% 甲基多保淨可濕性粉劑 (Thiophanate methyl，好速股份有限公司)、32.5% 亞托待克利水懸劑 (Azoxystrobin + Difenoconazole，先正達股份有限公司)、23% 亞托敏水懸劑 (Azoxystrobin，先正達股份有限公司)、23.6% 百克敏乳劑 (Pyraclostrobin，巴斯夫股份有限公司) 及 26% 得克利水基乳劑 (Tebuconazole，拜耳股份有限公司) 等幾種藥劑，配置成含有效成份濃度爲 1 ppm、10 ppm、100 ppm 之 PDA 培養基，另以不添加藥劑之 PDA 培養基作爲對照，再將直徑 0.5 cm 的菌絲塊，菌絲面朝下置入直徑 9 cm 之含藥的 PDA 培養基平板中央，置於 25℃ 之定溫箱中黑暗培養，於培養後第 2 天測量其菌絲生長之直徑，每個處理 5 重複，本實驗重複進行 3 次。試驗結果按下列公式換算藥劑對菌絲之生長抑制率。抑制率 (%) = (對照組生長直徑 − 藥劑處理組生長直徑/對照組生長直徑) × 100%。

藥劑對 *N. dimiditatum* 胞子發芽之影響

以無菌微量吸管吸取 50 μL 上述不同藥劑之溶液，置於 3 凹載玻片之凹槽內，再以無菌微量吸管吸取 1 μL 供試之 *N. dimiditatum* 胞子懸浮液，滴於含農藥之載玻片凹槽內，並混合均勻，使凹槽內混合液之有效成份濃度爲 10 ppm。供試載玻片並置於加有 5–10 mL 無菌水之 9 cm 塑膠培養皿中，將培養皿置於 30℃ 之定溫箱中經 16 h 後，於顯微鏡下逢機計算 100 個胞子之發芽率，每個處理 2 皿，6 重複，本實驗重複進行 2 次。以滅菌蒸餾水處理做爲對照組。

統計分析

各項處理之試驗資料利用 SAS 9.1 版統計分析體先進行變方分析 (analysis of variance; ANOVA)，再以最小顯著性差異 (least significant difference; LSD) 測驗，在 5% 顯著水準下比較處理間平均值之差異。

結果

紅龍果莖潰瘍病菌 (*N. dimidiatum*) 在紅龍果莖節病勢之進展

以莖潰瘍病菌分生胞子 (100 spores) 傷口接種於紅龍果莖節上時，約於接種 2 wk 後開始出現橘褐色小點，接種後 6 wk 於病斑上開始產生黑色之柄胞子堆，部份病斑會急速擴展，至接種後 12 wk 病斑組織穿孔掉落，18 wk 以後病斑持續向外擴展造成莖節腐爛 (圖 1)，此時病徵雖然可能暫時不會擴大，然在其乾孔內側亦佈滿菌體之分生胞子。另於田間人工接種莖節之同一植株於接種後 12 wk 開始有花苞，於接種後 16 wk 時發現果實上有褪色小點及橘點自然感染之病斑產生，病勢持續進展，至接種後 21 wk 時已有明顯之乾腐斑 (圖 2)。另若不製造傷口，直接將病原菌分生胞子噴佈於紅龍果莖節時，其於接種後 12 d 先出現大量小圓點褪色斑 (圖 3A)，接種後 26 d 大多數先前的小圓點斑已轉成小黃點斑及橘色點斑 (圖 3B)，接種後 41 d 橘色點斑病斑直徑擴大並增多 (圖 3C)，接種後 55 d 病斑開始褐化 (圖 3D)，至接種後 68 d，小病斑聚合成大且壞疽病斑 (圖 3E)，至接種後 89 d 時形成大面積壞疽病斑，病組織並有將脫落之情形 (圖 3F)。

溫度對病原菌菌絲生長及胞子發芽之影響

紅龍果莖潰瘍病菌菌絲塊培養於不同溫度之培養箱中，其生長結果如圖 4 所示，於 30℃ 及 35℃ 培養時，病原之生長最爲快速，於培養後 2 d 即可長滿整個直徑約 8.5 cm 之培養皿；於 25℃ 培養時其平均生長直徑爲 7.9 cm，而於 20℃ 培養時，其平均生長直徑爲 3.9 cm，於 40℃ 培養時其平均生長直徑則僅有 2.7 cm 左右，而 15℃ 培養時則平均生長直徑僅有 1.2 cm，10℃ 培養時病原則完全不生長。另外，溫度對本菌胞子發芽之影響結果則如表 1 所示，在 25℃ 下，於無菌水中 8 h，Nd-23 菌株之分生胞子有 50.2% 之發芽率，而 Nd-55 之分生胞子則有 64.2% 之發芽率；於 20–40℃ 時其胞

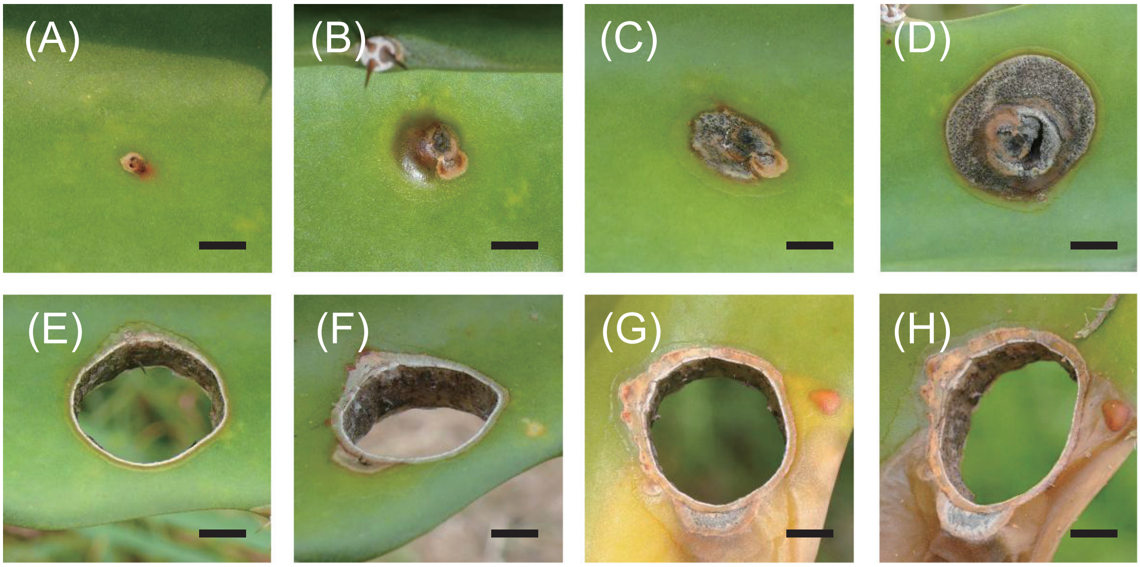

圖 1.　紅龍果莖節傷口接種莖潰瘍病菌 (*Neoscytalidium dimidiatum* Nd-23) 分生胞子後之病徵進展表現。(A)–(H) 分別為接種後 2、6、7、10、12、16、18 及 21 wk 之病徵。

Fig. l.　Symptoms of pitaya stem canker caused by Neoscytalidium dimidiatum Nd-23 isolate following inoculation on wounded stem for 2–21 weeks. (A)–(H) Symptoms appeared 2, 6, 7, 10, 12, 16, 18 and 21 weeks after inoculation, respectively. Bar = 1 cm.

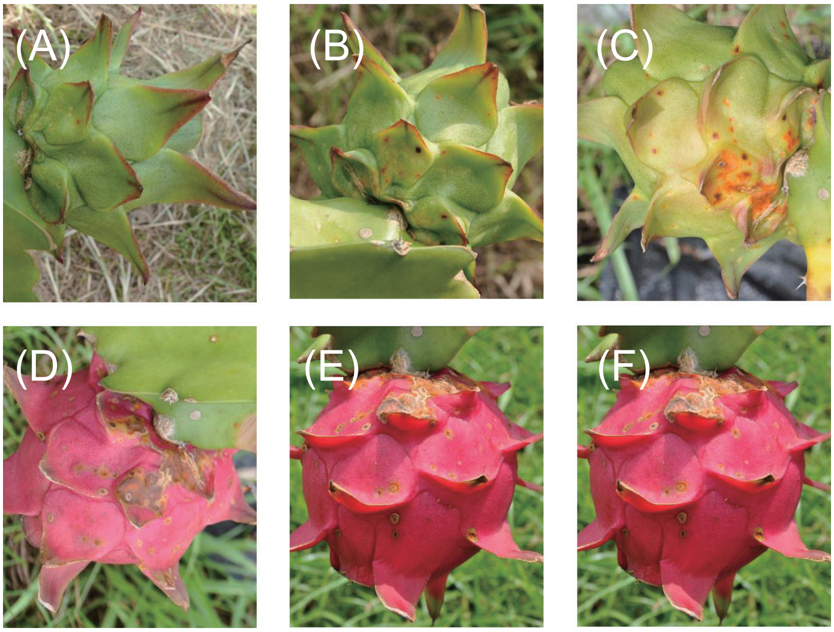

圖 2.　紅龍果果實於田間自然感染莖潰瘍病菌 (*Neoscytalidium dimidiatum*) 後之病徵表現。花苞在莖節接種後 12 wk 開始產生，於莖節接種 16 wk 後開始出現病徵。(A)–(F), 分別為莖節接種後 16、17、18、19、20 及 21 wk 時果實上感染之病徵。

Fig. 2.　Symptoms of pitaya fruits infected naturally by *Neoscytalidium dimidiatum* in the field. The floral bud produced 12 weeks after stem inoculation, and disease symptom occurred 16 weeks after inoculation. (A)–(F) symptoms on fruit appeared 16, 17, 18, 19, 20 and 21 weeks after stem, respectively.

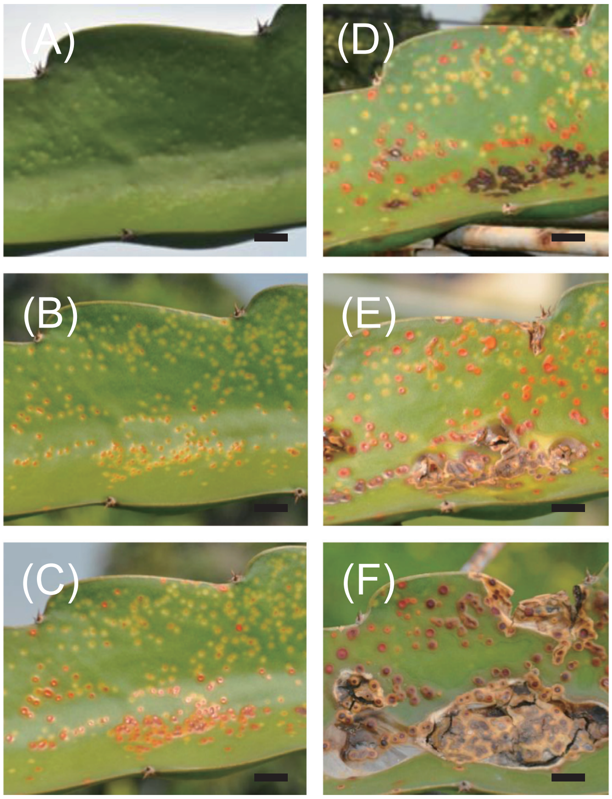

圖 3. 紅龍果莖節無傷口接種莖潰瘍病菌 (*Neoscytalidium dimidiatum* Nd-55) 分生胞子後之病徵進展表現。(A)–(F) 分別爲接種後 12、26、41、55、68 及 89 d 之病徵。

Fig. 3. Symptoms of pitaya stem caker caused by *Neoscytalidium dimidiatum* following inoculation on unwounded stem in the field. (A)–(F) symptoms appeared 12, 26, 41, 55, 68, and 89 days after, respectively. Bar = 1 cm.

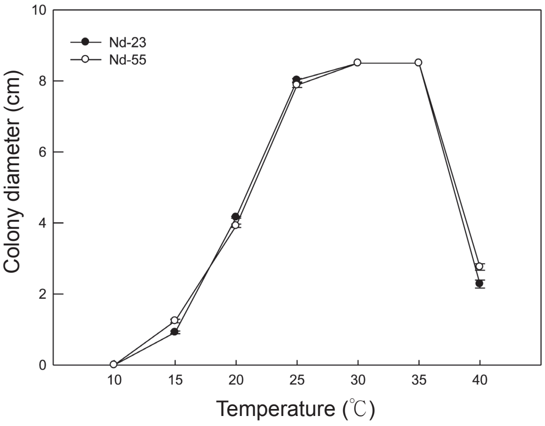

圖 4. 不同溫度對 *Neoscytalidium dimidiatum* Nd-23 及 Nd-55 分離株病原菌菌絲生長之影響 (在 PDA 平板培養 2 d)。

Fig. 4. Effect of temperature on the mycelial growth of *Neoscytalidium dimidiatum* Nd-23 and Nd-55 isolate cultured on potato dextrose agar plates for 2 days.

子置於無菌水中 24 h 之發芽率皆達 90% 以上，而 15℃ 不利胞子發芽，Nd-23 菌株之發芽率爲 2.2%，而 Nd-55 菌株則爲 12.2%；於 10℃ 下胞子則完全不發芽。

藥劑對病原菌菌絲生長及發芽之影響

將供試藥劑添加於 PDA 培養基，測試各藥劑對紅龍果莖潰瘍病菌絲生長之抑制效果，結果如表 2 所示，*N. dimidiatum* Nd-23 及 Nd-55 分離株於 10 ppm 有效成份藥劑濃度下，賽普護汰寧對其菌絲生長抑制率分別爲 100% 及 99.8%，其次爲亞托待克利，其對 Nd-23 及 Nd-55 菌絲生長之抑制率分別爲 69.2% 及 70.6%，而免得爛對 Nd-23 及 Nd-55 菌絲生長則完全無抑制效果。若於 100 ppm 之有效成份濃度下，則亞托待克利、得克利及賽普護汰

表 1. 溫度對紅龍果莖潰瘍病菌 Nd-23 及 Nd-55 分離株胞子發芽之影響。

Table 1. Effect of temperature on spore germination of *Neoscytalidium dimidiatum* Nd-23 and Nd-55 isolates.

	Percentage of spore germination (%)					
	8 h		12 h		24 h	
Temperature (℃)	Nd-23	Nd-55	Nd-23	Nd-55	Nd-23	Nd-55
10	0.0 e[z]	0.0 e	0.0 d	0.0 c	0.0 c	0.0 d
15	1.8 e	0.7 e	3.3 d	0.8 c	2.2 c	12.2 c
20	32.3 d	38.0 d	52.5 c	56.5 b	90.8 b	94.8 b
25	50.2 c	64.2 c	66.2 b	93.3 a	94.5 a	96.7 ab
30	61.3 b	79.7 b	79.8 a	95.0 a	95.5 a	98.0 a
35	78.2 a	88.0 a	77.2 a	95.2 a	94.7 a	97.5 a
40	54.5 c	91.0 a	79.3 a	96.7 a	94.8 a	96.2 ab
LSD	6.7	5.7	8.0	3.4	2.6	2.4

[z] Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by LSD test.

表 2. 不同殺菌劑對紅龍果莖潰瘍病菌 Nd-23 及 Nd-55 分離株菌絲生長之影響。

Table 2. Effect of different synthetic fungicides on mycelial growth of *Neoscytalidium dimidiatum* Nd-23 and Nd-55 isolates.

	Inhibition (%)[z]					
	1 ppm		10 ppm		100 ppm	
Fungicide	Nd-23	Nd-55	Nd-23	Nd-55	Nd-23	Nd-55
62.5% Cyprodinil + Fludioxonil (WG)	60.3 a[y]	58.4 a	100.0 a	99.8 a	100.0 a	100.0 a
80% Metiram (WG)	0.0 f	0.0 g	0.0 g	0.0 g	0.0 g	0.0 f
50% Trifloxystrobin (WG)	18.6 d	15.3 e	21.7 f	20.2 f	24.7 e	21.2 e
40% Iminoctadine (WP)	20.0 cd	24.4 c	61.3 c	56.9 c	71.7 b	74.1 b
70% Thiophanate methyl (WP)	0.0 f	0.0 g	30.4 e	30.2 e	64.9 c	61.0 c
32.5% Azoxystrobin + Difenoconazole (SC)	43.8 b	42.8 b	69.2 b	70.6 b	98.9 a	99.3 a
23% Azoxystrobin (SC)	19.9 cd	17.3 de	20.3 f	18.0 f	21.6 f	21.3 e
23.6% Pyraclostrobin (EC)	22.3 c	20.2 d	41.3 d	38.2 d	54.1 d	53.1 d
26% Tebuconazole (EW)	8.9 e	7.9 f	60.4 c	66.8 b	99.2 a	99.9 a
LSD (P = 0.05)	3.3	3.3	5.7	4.9	2.0	2.4

[z] Inhibition (%) = (Diameter of mycelial growth on PDA without fungicide − diameter of mycelial growth on PDA with fungicides/ diameter of mycelial growth on PDA without fungicide) × 100%.

[y] Means within a column followed by the same letter are not significantly different at 5% by LSD test.

寧對 Nd-23 及 Nd-55 菌株之菌絲皆可達到近 100% 的菌絲生長抑制率，而克熱淨次之，可分別對 Nd-23 及 Nd-55 菌株菌絲生長有 71.7% 及 74.1% 之生長抑制率，免得爛在 100 ppm 有效成份濃度下仍對菌絲生長無抑制作用。

藥劑對紅龍果莖潰瘍病菌胞子發芽之影響

測試藥劑對紅龍果莖潰瘍病菌分生胞子發芽之影響，結果如表 3 所示， Nd-23 其分生胞子於 10 ppm 有效成份濃度之免得爛、三氟敏、克熱淨、亞托待克利、亞托敏及百克敏處理下，其分生胞子之發芽率為 7% 以下，對於其胞子之發芽具有極佳的抑制性。其次，在 10 ppm 賽普護汰寧、甲基多保淨、得克利作用下其胞子發芽率分別為 16.3%、72.8% 及 72.7%。

Nd-55 其分生胞子於 10 ppm 有效成份濃

表 3. 殺菌劑對紅龍果莖潰瘍病菌 Nd-23 及 Nd-55 分離株胞子發芽之影響。

Table 3. Effect of fungicides on conidial germination of *Neoscytalidium dimidiatum* Nd-23 and Nd-55 isolates.

	Percentage of spore germination (%)[z]	
Fungicide	Nd-23	Nd-55
62.5% Cyprodinil + Fludioxonil (WG)	16.3 c[y]	41.8 c
80% Metiram (WG)	0.0 e	9.7 d
50% Trifloxystrobin (WG)	3.3 de	0.0 e
40% Iminoctadine (WP)	6.2 d	0.5 e
70% Thiophanate methyl (WP)	72.8 b	54.3 b
32.5% Azoxystrobin+ Difenoconazole (SC)	0.0 e	0.0 e
23% Azoxystrobin (SC)	0.3 e	0.0 e
23.6% Pyraclostrobin (EC)	0.0 e	0.0 e
26% Tebuconazole (EW)	72.7 b	58.5 b
CK	97.5 a	97.7 a
LSD (*P* = 0.05)	4.0	6.3

[z] Spore germination (%) = (No. of spore germinate on water with fungicide/No. of spore germinate on water without fungicide) × 100%.

[y] Means in each column followed by the same letter are not significantly different at *P* = 0.05 according to least significant different test.

度之三氟敏、克熱淨、亞托待克利、亞托敏及百克敏處理下，其分生胞子之發芽率為0–0.5%之間，對於其胞子之發芽具有極佳的抑制性。而 10 ppm 免得爛作用下之分生胞子發芽率為9.7%，另在 10 ppm 賽普護汰寧、甲基多保淨、得克利作用下其胞子發芽率分別為 41.8%、54.3% 及 58.5%。

討論

由 *N. dimidiatum* 引起之紅龍果莖潰瘍病或褐斑病已於 2012 年由台灣 (Chuang et al. 2012) 及中國大陸 (Lan et al. 2012) 先後發表。本菌在紅龍果肉質莖上自然感染時造成許多密集的小而圓的褪色點，而後病斑中心會呈現橘色小點，進而轉成褐色斑至腐爛斑。目前本菌在紅龍果上並無防治藥劑推薦，且其病原生理亦無研究資料可供參考。本研究於 2012 年 3 月於嘉義農業試驗分所進行田間紅龍果莖潰瘍病菌之接種，發現本菌之分生胞子不論是否存在傷口，均會造成紅龍果莖節潰瘍病病徵之表現，以分生胞子進行傷口接種之病徵較少呈現褪色小圓點斑，此與田間自然感染之初期病徵有些許差異，推測可能與本試驗大量胞子集中在同一接種點有關。自然感染可能由於分生胞子經雨水傳播後其已分散，因此其初期小而圓的褪色點病斑較為分散而明顯，此推論當以胞子懸浮液無傷口噴佈接種於紅龍果莖節時所得到的大量褪色小圓點斑得到證明。另於本試驗中發現，本病的擴展方式及速度依接種莖節之成熟度不同而有所差異，傷口接種時進展最快的病斑於接種後 6 wk 會造成莖節產生腐爛穿孔斑，而最慢者於接種後 9 mo. 仍停留在黃點斑，造成此現象之原因推測可能與莖節老化程度有關。田間觀察發現，成熟莖節之發病較不易進展為腐爛斑，其後期病班仍停留在橘點斑而未再擴大或擴展；而新梢感染時則病勢進展較快，未來將進一步探討莖節老化程度與病勢進展之間的相關性。由田間傷口接種莖節 12 wk 後，植株開始產生花苞、開花並進而結果，由接種後 16 wk 發現接種莖節產生之果實 (自花苞產生起約 4 wk 之果實) 即自然感染本病害之情形顯示，本病害在田間顯然可以產生二次感染源進行傳播。而經由水的飛濺是最可能的傳播方式，因此發病田田間的灌溉方式應盡量採用滴灌或溝灌，而勿用高空噴灌設施，以減少田間二次感染的可能性。另外田間分生胞子之來源除了病斑上明顯產生柄子器的病斑外，

另外一些由腐爛斑進展形成乾孔斑的內緣處均為本菌胞子存在之處，遇雨亦會產生感染源，因此在田間管理上亦應列為修剪清除之對象。

本研究另測試溫度對 *N. dimiatatum* 菌株菌絲生長及胞子發芽之影響，結果發現 25–35℃為其菌絲生長最適溫，顯示本菌在台灣的溫暖氣候下生存容易，20℃以下之生長會較為緩慢，病情較不易擴散。因此在冬天可進行清園工作，修剪罹病枝條並移出園外掩埋，減少開春後溫度回溫及雨水增多後之第一次感染源密度。另外在溫度對病原菌胞子發芽之影響上，本菌於 35℃於無菌水存在 2 h 之情形下，其分生胞子之發芽率即可達 20% 左右，但在 30℃以下時發芽率均近於零；而於 25–35℃無菌水存在 3 h 之情形下，則分生胞子之發芽率均已達 20% 左右 (資料未列出)。若於 25–40℃溫度下，游離水存在 8 h，分生胞子之發芽率均已達 50% 以上，顯示莖節上水分存在之時間長短攸關本病原胞子是否能順利發芽侵染紅龍果組織，因此於連續降雨時亦應加強防治以避免病原之侵染。以目前在台灣栽培之紅龍果白肉種約在 10 月開始萌發新生枝條，而紅肉種於 12 月開始萌發新生枝條 (Liou 2010)，而台灣近 30 年大約在 1 月以後平均溫度才會明顯可能下降至 18℃以下，且在 2 月上旬時，平均溫度就開始出現迅速回升的趨勢 (Chen 2008)。顯然不論是白肉種還是紅肉種之紅龍果，萌發新生枝條時均為適合本病原生長及胞子發芽之溫度，此時若遇降雨均會迅速導致本病害之發生。

本病害目前無防治藥劑推薦，本研究以目前推薦在紅龍果炭疽病之藥劑進行不同殺菌劑對紅龍果莖潰瘍病菌菌絲生長及胞子發芽之影響測試，結果顯示，10 ppm 有效成份濃度之賽普護汰寧、亞托待克利及得克利可有效抑制菌絲生長，而免得爛、三氟敏、百克敏、亞托敏、亞托待克利及克熱淨可顯著降低病原菌之胞子之發芽。因此雨季來臨前較適合使用抑制病原胞子發芽較有效果之藥劑，而雨季後宜選擇抑制菌絲生長較為有效之藥劑防治本病害之發生。由於炭疽病之侵染亦是於雨季較易傳播，因此兩病害可同時進行防治。

由本研究結果顯示紅龍果莖潰瘍病之病原菌 *N. dimidiatum* 為一適合台灣氣候條件生長之病原菌，其在冬季低溫下生長雖較慢，然而其生長並未停滯，有些已見產胞病兆之感染莖節應於採果後一併修剪或刻除，以免做為田間之感染源，另外發病田亦應避免以噴灌方式進行灌溉。新梢期為本病原較易感染植株之時期，於雨季時應加強藥劑防治，以降低田間病原菌之侵染，達到防治本病害之目地。

誌　謝

本研究工作承王晉鍾先生協助紅龍果果園管理、柯文琪小姐、曾怡婷小姐、陳幸萎小姐、吳貽文小姐協助試驗進行，特此致謝。

引用文獻

Chen, Y. L. 2008. Climate change of Taiwan in past century. Sci. Develop. 424:6–11. (in Chinese)

Chuang, M. F., H. F. Ni, H. R. Yang, S. L. Shu, S. Y. Lai, and Y. L. Jiang. 2012. First report of stem canker disease of pitaya (*Hylocereus undatus, H. polyrhizus*) caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in Taiwan. Plant Dis. 96:906.

Crous, P. W., B. Slippers, M. J. Wingfield, J. Rheeder, W. F. O. Marasas, A. J. L. Philips, A. Alves, T. Burgess, P. Barber, and J. Z. Groenewald. 2006. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. Stud. Mycol. 55:235–253.

Elshafie, A. E. and T. Ba-Omar. 2001. First report of *Albizia lebbeck* dieback caused by *Scytalidium dimidiatum* in Oman. Mycopathologia 154:37–40.

Lan, G. B., Z. F. He, P. G. Xi, and Z. D. Jiang. 2012. First report of brown spot disease caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on *Hylocereus undatus* in Guangdong, Chinese Mainland. Plant Dis. 96:1702.

Liou, P. C. 2010. Cultivation of Pitaya in Taiwan. Fengshan Tropical Horticultural Experiment Branch, Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture Press, Taichung. 32 pp. (in Chinese)

Liou, M. R., C. L. Hong, and R. F. Liou. 2004. Characterization of a cactus virus X infecting *Hylocereus undatus* and its detection by DAS-ELISA. Plant Pathol. Bull. 13:27–34. (in Chinese with English abstract)

Palmateer, A. J. and R. C. Ploetz. 2006. Anthracnose of pitahaya: A new disease on a new crop in south Florida. Proc. Fla. State Hort. Soc. 119:50–51.

Palmateer, A. J., R. C. Ploetz, E. van Santen, and J. C. Correll. 2007. First report of anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on pitahaya. Plant Dis. 91:631.

Polizzi, G., D. Aiello, A. Vitale, F. Giuffrida, J. Z. Groenewald, and P. W. Crous. 2009. First report of shoot blight, canker, and gummosis caused by *Neoscytalidium dimidiatum* on citrus in Italy. Plant Dis. 93:1215.

Ray, J. D., T. Burgess, and V. M. Lanoiselet. 2010. First record of *Neoscytalidium dimidiatum* and *N. novaehollandiae* on *Mangifera indica* and *N. dimidiatum* on *Ficus carica* in Australia. Australas. Plant Dis. Notes 5:48–50.

Sijam, K., Y. Awang, and M. G. M. Satar. 2008. Fungi associated with diseases on dragon fruit (*Hylocereus* spp.) in Peinsular Malaysia. p. 234–237. *in*: Proceedings of the Microbes: Biotechnology Engine for Health and Wealth Creation. August 16–19, 2008. Kuantan. Malaysia. Malaysian Society for Microbiology. Kuantan.

Taba, S., N. Miyahara, K. Nasu, T. Takushi, and Z. I. Moromizato. 2007. Fruit rot of strawberry pear (pitaya) caused by *Bipolaris cactivora*. J. Gen. Plant Pathol. 73:374–376.

Tsai, Y. F. 2004. Etiology of pitaya stem rot. Master thesis. Department of Plant Protection, National Pintung University of Science and Technology. Pintung, Taiwan. 21 pp. (in Chinese with English abstract)

Valencia-Botin, A. J., J. S. Sandoval-Islas, E. Cárdenas-Soriano, T. J. Michailides, and G. Rendón-Sánchez. 2003. *Botryosphaeria dothidea* causing stem spots on *Hylocereus undatus* in Mexico. Plant Pathol. 52:803.

Wang, C. L. and C. C. Lin. 2005. Fruit rot of pitaya stem rot of cacti in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 14:269–274. (in Chinese with English abstract)

Yen, C. R. 2005. Pitaya. Taiwan Agriculture Encyclopedia. Harvest Farm Magazine Press, Taipei. 926pp. (in Chinese)

Pathogen Characterization and Fungicide Screening of Stem Canker of Pitaya

Hui-Fang Ni[1], Chiao-Wen Huang[2], Sui-Li Hsu[3], Su-Yu Lai[3], and Hong-Ren Yang[4,*]

Abstract

Ni, H. F., C. W. Huang, S. L. Hsu, S. Y. Lai, and H. R. Yang. Pathogen characterization and fungicide screening of stem canker of pitaya. J. Taiwan Agric. Res. 62(3):225–234.

Pitaya canker is an emerging disease in recent years which limits the production of pitaya. We inoculated pitaya stems with *Neoscytalidium dimidiatum* in the field. Initial canker lesion was first appeared 2 weeks after wound inoculation and the formation of black pycnidia was observed 6 weeks after inoculation. The lesion could fall out and form shot-hole symptom 12 weeks after inoculation. The infection could extend from the shot-hole edge and resulted in the collapse of a large area of stem tissue 18 weeks after inoculation. The optimal temperatures for mycelial growth and spore germination of *N. dimidiatum* were 25–35℃ and 25–40℃ , respectively. Mycelial growth was effectively inhibited by Cyprodinil + Fludioxonil, Azoxystrobin + Difenoconazole and Tebuconazole. Spore germination of *N. dimidiatum* was inhibited by 80% Metiram, 50% Trifloxystrobin, Pyraclostrobin, Azoxystrobin, Azoxystrobin + Difenoconazole and Iminoctadine. These fungicides have been recommended for the control of anthracnose of pitaya, and could also be used to control stem canker of pitaya in the field.

Key words: Pitaya (*Hylocereus* sp.), Stem canker, *Neoscytalidium dimidiatum*, Fungicide screening.

Received: March 19, 2013; Accepted: June 14, 2013.

* Corresponding author, e-mail: caes@dns.caes.gov.tw

1 Associate Research Fellow and Head of Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Station, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

2 Assistant Research Fellow, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Station, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

3 Research Assistant, Department of Plant Protection, Chiayi Agricultural Experiment Station, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

4 Research Fellow and Director of Chiayi Agricultural Experiment Station, Taiwan Agricultural Research Institute, Chiayi, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 62(3):235–248 (2013)
DOI: 10.6156/JTAR/2013.06203.04

粳稻新品種 ‘台農 77 號’ 之育成

李長沛[1] 顏信沐[1] 卓緯玄[1] 吳東鴻[1] 曾清山[2] 曾東海[3] 賴明信[4,*]

摘要

李長沛、顏信沐、卓緯玄、吳東鴻、曾清山、曾東海、賴明信。2013。粳稻新品種 ‘台農 77 號’ 之育成。台灣農業研究 62(3):235–248。

稻米品質改良一直以來都是國內水稻育種的主要目標，為了育成具有日本 ‘越光’ 米品質且適合台灣栽培環境之良質米品種，農委會農業試驗所自 1997 年第二期作以 ‘農林 22 號’ 與 ‘農林 1 號’ 進行雜交。早期世代以改良式之混合育種法進行固定，隨後以譜系法進行選育，歷經觀察試驗、初級及高級產量試驗，選出 ‘台農育 914079 號’ 參加 2004 年早熟組 稻區域試驗及各項特性檢定。綜合各級試驗及特性檢定結果，‘台農育 914079 號’ 新品系具有中早熟、抗倒伏及高產潛能等優良特性；此外，稻米外觀及米飯食味品質等也皆有優良表現，並具米飯香味。故於 2011 年命名為 ‘台農 77 號’，以供農民及消費者更多的選擇與利用。

關鍵詞：粳稻、產量、良質米。

前言

稻米爲國人主食，水稻爲台灣主要栽培作物，根據行政院農業委員會農糧署 2011 年農業統計年報的資料顯示，2011 年稻作栽培面積第一、二期作合計約 25 萬公頃，粳稻栽培面積占 95% 以上。由於台灣每年稻米消費量逐年遞減，目前每年每人消費的稻米量約 46 kg，1970 年以來由於稻米生產過剩的收購壓力，也使得國內稻米生產從以往的量產逐漸轉向以優良米質爲導向的消費市場，各試驗改良場所的育種目標也隨之改變 (Lin 2006)，良質及多元化利用的育種目標逐漸成爲品種改良的趨勢。在其他東南亞主要的產米國家，稻米消費量遞減的現象也受到矚目，而客戶 (生產者及消費者) 導向的育種目標已逐漸成爲多數稻米生產國在水稻品種改良上的依據 (Joshi *et al*. 2007)。國內近年來因公糧保價收購的價格高於一般市場價格，使得多數農民對產量的需求仍重於米質的要求，但消費者對品質的需求卻依然高漲，如何在生產端與消費者端之間取得平衡，往往是育種者兩難的抉擇，選育兼具高品質又高產潛力的品種更是育種者的終極目標。

粳稻於日據時代由日本引進台灣試種與推廣，使得原本的栽培品種由秈稻 (Indica rice) 轉變成粳稻 (Japonica rice) (Teng 2003)，因此台灣粳稻之育種多數傳承自日本研究學者的腳步，幾乎所有粳稻品種改良之親本均來自日本的稉型品種 (Lin 1991)。近年來，雖然在產量改進上已導入其他外來種源的基因，但在食味品質改良上仍以日本的良質品種爲重要親源 (Wu & Lin 2008)。其中日本 ‘越光’ (‘Koshihikari’) 的稻米品質是多數粳稻育種者的追求目標之一，‘越光’ 於 1956 年命名推廣後，在日本的栽培面積逐年擴大，於 1979 成爲日本栽培面積最廣的品種，在目前稻米消費量逐年降低、品種推陳出新的日本，其栽培面積仍有增無減；根據日本農研機構作物研究所網站 (http://

投稿日期：2013 年 3 月 25 日；接受日期：2013 年 7 月 1 日。
* 通訊作者：mhlai@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所作物組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所作物組前副研究員。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所作物組副研究員。台灣 台中市。

ineweb.narcc.affrc.go.jp) 資料，持續至 2012 年，‘越光’ 每年在日本的栽培面積已超過 55 萬公頃，約佔總栽培面積 38%，仍是日本栽培面積最多的品種。目前在日本仍以改進 ‘越光’ 適應性爲目標 (Ishizaki *et al*. 2005; Takeuchi *et al*. 2006)，更是學術研究與應用的主要品種 (Yamamoto *et al*. 2001; Fukuoka *et al*. 2010)。

‘越光’ 在台灣進行栽培仍保有早熟與米質之優良特性，但容易倒伏且具產量低、病蟲害抗性偏弱等缺點限制該品種在國內的發展，國內育成品種中直接以 ‘越光’ 爲親本之一選育出的品種有 ‘台中 191 號’ (Yang *et al*. 2005) 及 ‘高雄 146 號’ (Chung *et al*. 2008)，而目前稉稻區域試驗稻米品質對照的品種 ‘台稉 9 號’，則是利用 ‘越光’ 之誘變品種 ‘北陸 100 號’ 與國際稻米研究所引進的秈稻品系雜交選育而得 (Sheu & Song 1993)，其外觀品質隨栽培地區與氣象因素而有差異，但其優良的食味品質目前仍受到各界的重視。‘台農 71 號’ 香米品種及 ‘高雄 145 號’ 也是利用深具日本 ‘越光’ 親緣關係的 ‘絹光’ (‘Kinuhikari’) 與國內稉型品種雜交所選育出的良質品種 (Lai *et al*. 2001; Chiu & Wu 2007)。

‘越光’ 的親本 ‘農林 1 號’ 及 ‘農林 22 號’ 分別在 1931 年及 1943 年育成，根據日本農研機構作物研究所網站之統計資料，在日本利用 ‘越光’ 兩親本直接選育出之品種除 ‘越光’ 外，尚有多個品種進入國家品種名單，如 ‘越路早生’、‘ハツニシキ’ (‘Hatsunishiki’；‘奥羽 224 號’；‘農林 84 號’)、‘ホウネンワセヤ’ (‘越南 14 號’；‘農林 91 號’)、‘マセニシキ’ (‘Yamasenishiki’；‘奥羽 225 號’；‘農林 139 號’) 等品種；利用兩親之一所育成的品種 (系) 更多達 420 個以上，加上其衍生的品種，日本育成之品種幾乎與這兩親本脫離不了親緣關係，尤其在米質改良的利用上，更顯得 ‘農林 22 號’ 及 ‘農林 1 號’ 在日本育種上的重要性 (Oosato & Yashida 1996; Sato & Yoshida 2007; Shigemune *et al*. 2010)。鑒於 ‘農林 1 號’ 及 ‘農林 22 號’ 深具很高的品種改良之潛力，因此農業試驗所試著利用這兩個親本在台灣進行雜交選育，歷經各項選拔及檢定試驗，評選出 ‘台農育 914079 號’ 品系，並於 2011 年 6 月 15 日正式命爲 ‘台農 77 號’，獲得媲美日本 ‘越光’ 之稻米品質又能適合台灣栽培之新品種。本文說明 ‘台農 77 號’ 育成經過及各種試驗中之優良特性表現，並提出栽培管理要點供各界參考。

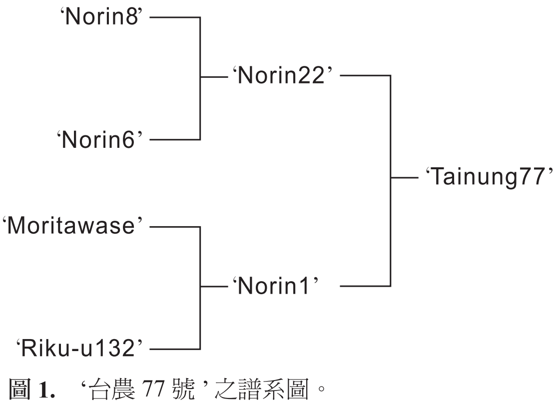

圖 1. ‘台農 77 號 ’ 之譜系圖。

Fig. 1. Pedigree of rice variety ‘Tainung 77’.

材料及方法

親本選擇

‘台農 77’ 系譜如圖 1 所示，兩親本分別爲 ‘農林 22 號’ 及 ‘農林 1 號’。‘農林 22 號 ’ 爲 1943 年於日本兵庫縣近畿試驗場育成，對稻熱病具有抗性、米質優良食味佳及植株略高易倒伏；‘農林 1 號 ’ 爲 1931 年於日本新瀉縣新瀉農事試驗場上越試驗地育成，早熟、抗稻熱病、米質優良、不易倒伏及脫粒性難 (Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan 1989)。

選育方法及過程

‘台農 77 號’ 的選育過程如表 1 所示，農業試驗所於 1997 年第二期作繁殖親本 ‘農林 22 號’ 及 ‘農林 1 號’，並於 10 月中旬進行雜交。1998 年第一期作繁殖 F_1 植株 (組合代號 TKC 871405)，後代 F_2–F_4 於 1998 年第二期作至 1999 年第二期作進行，以改良的混合法進行選拔與固定，即 F_2–F_4 行集團栽培均單本植，成熟時選取優良單株，每單株收取 3–5 粒種子混合下一世代種子，每世代繁殖約 2,000

表 1. ‘台農 77 號’ 育成經過。

Table 1. Breeding procedures for rice variety, ‘Tainung77’ (‘TNG77’).

Year/crop season	Generation	Processes carried out	Executive organization
1997 2^{nd}	Parent	Norin 22 × Norin 1	TARI[y]
1998 1^{st}	F_1	30 plants, single seedling	
1998 2^{nd}–1999 1^{st}	F_2–F_3	2,000 plants, single seedling, modified bulk method[z]	
1999 2^{nd}	F_4	2,000 plants, single seedling, pedigree selection	
2000 1^{st}	F_5	91 strains joined in purity trial	
2000 2^{nd}	F_6	41 strains joined in observation experiment	
2001 1^{st}–2^{nd}	F_7–F_8	3 lines joined in preliminary yield test	
2002 1^{st}–2003 2^{nd}	F_9–F_{12}	Advanced yield test	
2004 1st–2005 2^{nd}	F_{13}–F_{16}	Regional test, rice quality, biotic and abiotic stress evaluation	TARI and DARES[x]
2006 1^{st}–2010 2^{nd}		Breeder’s seed propagation, Rice texture analysis	TARI
2011 1^{st}		Publish of newly variety Tainung77	

[z] The modified bulk method is selected the better plants and take off 3–5 fertilized spikelets per plant for next generation.
[y] TARI: Taiwan Agricultural Research Institute.
[x] Evaluation organization including Taoyuan, Taichung, Tainan, Kaoshong, Hualian, and Taidong District Agricultural Research and Extensive Station and Chiayi Agricultural Experiment Station of TARI.

株。於 1999 年第二期作 (F_4) 則自 2,000 株中選拔優良單株 91 株，於 2000 年第一期作種植成 F_5 品系，經田間觀察及糙米外觀評估選出 41 個品系進入新品系觀察試驗 (F_6)，2000 年第二期作新品系觀察試驗採多本植，經田間外表型觀察評選出 9 個品系進入初級產量試驗。初級產量試驗於 2001 年第一、二期作 (F_7–F_8) 進行，每品系 2 重複，每重複 60 株，多本植，經產量評估選出 3 個品系進入兩年四期作的高級產量比較試驗。高級產量比較試驗於 2002、2003 年之第一、二期作進行 (F_9–F_{12})，每品系 4 重複、每重複 100 株，多本植，以 ‘台農 67 號’ 爲對照品種，經產量及米質評估，選出最優之品系並登記爲 ‘台農育 914079 號’ (‘TNGY914079’)，參加稉稻 2004 年早熟組區域試驗。區域試驗 (F_{13}–F_{16}) 於 2004、2005 年之第一及第二期作於桃園區 (桃園縣新屋鄉)、台中區 (彰化縣大村鄉)、台南區 (嘉義縣鹿草鄉) 及高雄區 (屏東市) 農業改良場進行，以早熟品種 ‘台稉 11 號’ 爲區域試驗之產量對照品種，另以品質優良之早熟品種 ‘越光’ 及中晚熟品種 ‘台稉 9 號’ 爲米質分析時之對照品種，進行米質、各項病蟲害抗性及環境逆境抗性的檢定，同組之區域試驗品系尚有 ‘桃園育 52413 號’ (‘TY52413’)、‘中稉育 20313 號’ (‘CKY20313’)、‘高雄育 4215 號’ (‘KHY4215’)。同年並於農業試驗所，以 ‘台稉 11 號’ 爲對照品種，進行氮肥效應試驗。2006–2010 年於農業試驗所進行大面積試種及原原種繁殖。各級產量試驗及特性檢定方法，係參考 Lai *et al.* (2007) 之試驗設計、調查方法及資料分析。

結果

初級產量比較試驗

初級產量比較試驗於 2001 年第一、二期作進行，‘台農育 914079 號’ 之生育期分別較對照 ‘台農 67 號’ 早熟 4 d 及 7 d；株高較 ‘台農 67 號’ 高出 3 cm 及 3.9 cm；分蘗數多出 ‘台農 67 號’ 3.4 支及 2.4 支。在產量表現上，‘台農育 914079 號’ 第一期作爲 8,717.6 kg ha^{-1} 高出對照品種 ‘台農 67 號’ 3.5%，第二期作爲 4,851 kg ha^{-1} 高出對照品種達 11%。

高級產量比較試驗

高級產量比較試驗於 2002–2003 年第一、二期作進行，結果顯示在生育及農藝性狀上，除第一期作 ‘台農育 914079 號’ 的生育日數爲 74.6 d 較對照品種 ‘台農 67 號’ 提早 3.8 d 抽穗外，在株高、穗長、穗重均與對照品種 ‘台

農 67 號’ 無顯著性差異；第一、二期作 ‘台農育 914079 號’ 之株高分別為 106.9 cm、96 cm；分蘗數分別為 15.9、14.2 支；穗長分別為 18.8 cm、18.7 cm；單穗重分別為 2.1 g、1.9 g。在產量及其構成性狀方面 (表 2)，除第二期作 ‘台農育 914079 號 ’ 之千粒重為 25.2 g 較對照品種 ‘台農 67 號’ 之 23.5 g 為重外，其兩期作在產量、穗數、每穗粒數及稔實率均與 ‘台農 67 號’ 無顯著差異。

區域試驗

主要農藝性狀之表現：‘台農育 914079 號’ 抽穗期第一期作於各試驗區較 ‘台稉 11 號’ 晚 1–5 d，以屏東差異最小 (1 d)，新屋差異最大 (5 d)；第二期作較 ‘台稉 11 號’ 晚 2–8 d，仍以屏東差異最小 (2 d)，但以大村差異最大 (8 d)；至成熟期之全生育日數，第一期作各試驗區較 ‘台稉 11 號’ 晚 1–8 d，以屏東差異最小 (1 d)，大村差異最大 (8 d)，第二期作各試驗區則較 ‘台稉 11 號’ 晚 6–10 d，仍以屏東市差異最小 (6 d)，大村差異最大 (10 d)。‘台農育 914079 號’ 之株高與穗長於 4 個參試地點之表現，除第一期作於屏東與 ‘台稉 11 號’ 無顯著差異外，其餘期作及地點均高於對照品種 ‘台稉 11 號’ 及 ‘越光’，穗重則除於桃園地區與對照品種無顯著差異外，其餘試驗區都較對照品種為重，且都高於 ‘越光’ 品種 (表 3)。

產量構成性狀及產量之表現：第一期作除嘉義試驗區外，‘台農育 914079 號’ 的穗數均低於 ‘台稉 11 號’，每穗粒數及稔實率則與 ‘台稉 11 號’ 無顯著差異，千粒重則明顯較 ‘台稉 11 號’ 及 ‘越光’ 重，於嘉義試驗區最重高達 28.4 g。第二期作穗數、每穗粒數、稔實率皆與 ‘台稉 11 號’ 無顯著差異，千粒重除桃園試驗區外均較 ‘台稉 11 號’ 重，嘉義試驗區千粒重可達 27.7 g；與 ‘越光’ 相比則每穗粒數有較多的表現 (表 4)。

‘台農育 914079 號’ 之產量兩期作於各參試地點均與 ‘台稉 11 號’ 無明顯差異。與米質對照品種 ‘越光’ 相比，除新屋之第一期作無顯著差異外，均高於 ‘越光’ 品種。‘台農育 914079 號’ 之產量第一期作為 3,921–7,804 kg ha^{-1}，第二期作為 4,399–6,432 kg ha^{-1}，均以新屋產量最低，鹿草產量最高。與 ‘台稉 11 號’ 比較，除新屋外均達 ‘台稉 11 號’ 之 95% 以上，最可高達 110% (鹿草)。

產量穩定性分析：區域試驗於桃園 (新屋)、嘉義 (鹿草)、彰化 (大村) 及屏東市進行兩年四期作，根據 Finlay & Wilkinson (1963) 之穩定性直線回歸分析方法檢定區域試驗的品種穩定性，結果顯示 ‘台農育 914079 號’ 的穩定性回歸係數於第一期作為 1.25 (> 1)，但產量高於所有參試材料之平均產量，顯示 ‘台農育 914079 號’ 雖易受環境有利或不利影響而有較

表 2. ‘台農育 914079 號’ 高級產量試驗之產量要素及其產量表現。

Table 2. Performance of yield components and yield of ‘TNGY914079’ in advanced yield trial.

Variety (Line)	Panicle number	Spikelet/panicle	Seed set (%)	1000-grain weight (g)	Yield (kg ha^{-1})	Ratio (%)[z]
First crop						
TNGY914079	15.1 a[y]	87.2 a	88.7 a	25.7 a	6,695.2 ab	92.1
TNG67	16.3 a	89.8 a	86.0 a	23.8 b	7,270.5 a	100.0
TK9	16.3 a	97.8 a	85.8 a	22.4 b	6,527.2 b	89.8
LSD (0.05)	2.1	10.8	6.5	1.8	1,247.0	
Second crop						
TNGY914079	14.5 a	70.5 a	82.6 a	25.2 a	5,619.0 a	101.9
TNG67	14.0 a	68.6 a	83.7 a	23.5 b	5,512.1 a	100.0
TK9	15.0 a	74.3 a	84.9 a	23.9 ab	5,614.9 a	101.9
LSD (0.05)	2.1	20.5	5.9	1.3	1,478.9	

[z] Ratio (%): expressed as percentage of ‘TNG67’ (‘Tainung67’).

[y] Means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by Fisher’s protected LSD test.

表 3. ‘台農育914079號’ 區域試驗之農藝性狀表現。

Table 3. Performance of main characters of ‘TNGY914079’ in regional yield trial.

	Heading days		Maturity days		Plant height (cm)		Panicle length (cm)		Panicle weight (g)	
Variety (Line)	1st crop	2nd crop	1st crop	2nd crop	1st crop	2nd crop	1st crop	2nd crop	1st crop	2nd crop
Taoyaun										
TNGY914079	98.7 a[z]	70.5 a	132.3 a	115.5 a	91.8 a	92.2 a	17.0 a	18.6 a	1.5 a	1.7 ab
Koshihikari	75.4 b	49.4 b	108.9 b	94.4 b	85.3 b	80.8 b	14.3 b	14.9 b	1.2 a	1.0 b
TK11	93.8 a	66.9 a	127.3 a	111.9 a	88.8a b	86.5 c	14.2 b	16.1 b	1.4 a	1.8 a
LSD (0.05)[y]	5.1	6.2	5.1	6.3	5.8	4.6	1.0	1.3	0.4	0.8
Chunghua										
TNGY914079	79.9 a	65.8 a	113.6 a	108.6 a	101.2 a	96.3 a	16.6 a	17.0 a	2.3 a	2.1 a
Koshihikari	65.5 c	42.0 b	95.5 c	81.5 c	89.4 b	74.9 b	13.8 b	12.8 c	1.4 b	0.8 b
TK11	77.3 b	63.6 a	106.3 b	99.8 b	91.7 b	88.9 c	13.6 b	14.9 b	1.9 c	2.0 a
LSD (0.05)	2.2	2.5	2.9	3.2	4.7	2.8	1.3	0.7	0.3	0.2
Chia-I										
TNGY914079	87.1 a	72.8 a	122.0 a	116.0 a	106.5 a	101.6 a	19.7 a	19.7 a	2.4 a	2.5 a
Koshihikari	71.9 c	48.5 c	103.0 b	81.0 c	96.0 b	84.1 b	16.6 b	16.3 b	1.6 b	1.1 b
TK11	83.1 b	64.6 b	119.0 a	105.5 b	97.3 b	93.9 ab	16.5 b	17.2 b	2.4 a	2.3 a
LSD (0.05)	2.4	4.8	3.9	5.4	5.2	7.9	1.5	2.6	0.4	1.6
Pingdong										
TNGY914079	84.5 a	76.5 a	119.0 a	112.0 a	102.4 a	102.2 a	17.0 a	19.2 a	1.8 a	2.3 a
Koshihikari	68.5 b	50.5 b	101.5 b	89.0 b	95.4 a	84.4 c	15.4 a	15.8 c	1.3 b	0.9 c
TK11	84.0 a	72.0 a	117.5 a	106.0 a	95.4 a	94.9 b	15.3 a	18.4 b	1.9 a	2.1 b
LSD (0.05)	5.9	12.8	6.2	7.8	7.0	4.5	1.6	0.5	0.3	0.2

[z] Means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by Fisher’s protected LSD test.
[y] LSD (0.05): values of least significant difference for mean comparisons at 5% level.

高或較低之產量，但在良好環境下則可獲更高產之表現。第二期作的穩定性回歸係數爲 0.96 近於 1，相對於其他對照品種表現穩定。合併兩期作之一般穩定性分析，‘台農育 914079 號’ 之穩定性回歸係數爲 0.99，產量 (5,890 kg ha^{-1}) 與對照品種 ‘台稉 11 號’ (5,893 kg ha^{-1}) 相近，但高於所有參試材料之平均產量，顯示 ‘台農育 914079 號’ 仍具有高產且穩定之表現 (表 5 僅摘錄 ‘台農育 914079 號’ 及對照品種)。

非生物逆境特性檢定

倒伏性檢定：經 2004–2005 年計二年四期作委由桃園區農業改良場於新竹縣竹東鎮進行倒伏性檢定，結果顯示第一期作 ‘台農育 914079 號’ 之抗倒伏性爲 3 (MR；直–斜)–5 級 (MS；斜)，優於 ‘台稉 11 號’ 之 3 (MR；直– 斜)–9 級 (HS；倒)，‘越光’ 則均爲 5 級 (MS；斜)。第二期作 ‘台農育 914079 號’ 之抗倒伏性均爲 1 級 (R；直)，‘台稉 11 號’ 1–5 級，‘越光’ 則爲 1–3 級。由此可見，‘台農育 914079 號’ 之抗倒伏能力優於兩對照品種 (表 6)。

耐寒性檢定：經 2004 年第一期作及 2005 年第一、二期作委由桃園區農業改良場進行耐寒性檢定，第一期作之檢定爲秧苗期之耐寒性，第二期作檢定爲成熟期之耐寒性。結果顯示 ‘台農育 914079 號’ 之耐寒性與 ‘台稉 11 號’ 相同，第一期作均具耐寒性 (R)，第二期作則爲中感 (MS)–感 (S)，可見 ‘台農育 914079 號’ 具有秧苗期的耐寒性，唯成熟期耐寒性仍欠理想 (表 6)。

穗上發芽及脫粒性檢定：經 2004–2005 年計二年四期作委由花蓮區農業改良場進行檢定，

表 **4.** ‘台農育 914079 號’ 區域試驗之產量及其構成要素表現。

Table 4. Performance of yield and yield components of ‘TNGY914079’ in regional yield trial.

	Panicle number per hill		Spikelet number per panicle		Spikelet fertility (%)		1000-grain weight		Paddy yield			
									1st crop		2nd crop	
Variety (Line)	1st crop	2nd crop	1st crop	2nd crop	1st crop	2nd crop	1st crop	2nd crop	(kg ha^{-1})	(%)[z]	(kg ha^{-1})	(%)
Taoyaun												
TNGY914079	14.1 c[y]	12.8 a	64.0 a	81.1 a	77.3 a	70.9 a	25.7 a	24.2 a	3,921 ab	88.2	4,399 a	91.7
Koshihikari	18.7 a	14.1 a	59.4 a	45.5 b	75.0 a	81.0 a	23.0 b	23.7 a	3,217 b	72.4	2,707 b	56.5
TK11	16.5 b	13.2 a	75.2 a	88.0 a	77.5 a	78.4 a	21.8 b	21.7 a	4,443 a	100.0	4,794 a	100.0
LSD (0.05)[x]	1.9	3.2	22.4	12.9	10.8	23.8	2.3	2.7	1,106		1,062	
Chunghua												
TNGY914079	14.9 c	12.0 a	80.8 a	84.8 a	94.7 a	86.7 a	28.3 a	26.4 a	7,198 a	100.5	5,192 a	96.9
Koshihikari	20.9 a	18.3 a	62.5 b	38.0 b	80.3 b	83.3 a	24.4 b	23.2 b	5,391 b	75.3	2,454 b	45.8
TK11	17.8 b	14.1 a	78.7 a	89.3 a	92.5 a	87.7 a	24.9 b	23.8 b	7,159 a	100.0	5,356 a	100.0
LSD (0.05)	2.4	6.5	13.1	10.1	7.2	12.9	0.9	1.8	386		1,147	
Chiayi												
TNGY914079	15.3 a	13.6 b	86.5 ab	91.3 a	88.9 ab	91.6 a	28.4 a	27.7 a	7,804 a	101.1	6,432 a	110.3
Koshihikari	17.9 a	16.9 a	73.5 b	45.4 b	87.2 b	81.6 a	22.5 c	23.9 ab	4,725 c	61.2	2,726 b	46.7
TK11	15.7 a	14.0 b	99.8 a	105.7 a	91.9 a	88.7 a	24.6 b	22.6 b	7,718 a	100.0	5,834 a	100.0
LSD (0.05)	4.3	1.7	18.5	32.0	7.7	12.9	1.4	6.9	474		2,521	
Pingdong												
TNGY914079	19.2 b	12.9 b	76.4 ab	98.9 a	83.6 a	76.8 a	26.0 a	26.1 a	7,244 a	98.9	4,933 a	109.2
Koshihikari	23.2 a	15.4 a	64.0 b	62.2 b	80.3 a	56.1 b	22.9 b	23.2 b	5,233 b	71.5	2,478 b	54.9
TK11	22.2 ab	13.6 b	90.0 a	97.8 a	86.9 a	81.4 a	22.3 b	23.2 b	7,322 a	100.0	4,517 ab	100.0
LSD (0.05)	2.8	0.9	7.9	11.6	6.6	12.8	0.8	0.7	1,315		2,101	

[z] Ratio (%): expressed as percentage of ‘TK11’ (‘Taikeng11’).
[y] Means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by Fisher’s protected LSD test.
[x] LSD (0.05): values of least significant difference for mean comparisons at 5% level.

表 5. 稉稻區域試驗早熟組參試品系稻穀產量之穩定性分析。

Table 5. Stability analysis of grain yield for the early mature group in regional yield trail.

Variety (Line)	Yield (kg ha^{-1})	b[z]	SE[y]
First crop season			
TNGY914079	6,542 a[x]	1.25*[w]	0.071
Koshihikari	4,642 b	0.70*	0.129
TK11	6,661 a	1.08	0.064
Second crop season			
TNGY914079	5,239 a	0.96	0.199
Koshihikari	2,591 b	-[v]	-
TK11	5,125 a	1.08	0 .225
Combined			
TNGY914079	5,890 a	0.99	0.078
Koshihikari	3,617 b	-	-
TK11	5,893 a	0.99	0.066

[z] b: Stability coefficient obtained from Finlay and Wilkinson (1963) method.
[y] SE: Standard error of stability coefficient.
[x] Means within each column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by Fisher’s protected LSD test.
[w] Significantly different from 1 at 0.05 level.
[v] Not recorded.

表 6. ‘台農育 914079 號’ 非生物逆境特性檢定結果。

Table 6. Evaluation of abiotic stress characters of ‘TNGY914079’.

	Culm strength		Cold tolerance		Pre-harvest sprouting		Panicle thresh ability	
Variety (Line)	Lodging	Scale	Reaction	Scale	%	Scale	%	Scale
First crop season								
TNGY914079	MR–MS[z]	3–5	R	1	5–85	1–9	33–42	7
Koshihikari	MS	5	R	1	3–5	1	1	1
TK11	MR–HS	3–9	R	1	20–76	1–9	16–34	5–7
Second crop season								
TNGY914079	R	1	MS–S	5–7	16–60	1–5	14–31	5–7
Koshihikari	R–MR	1–3	R–HS	1–9	23–27	1	1–6	1–5
TK11	R–MS	1–5	MS–S	5–7	25–54	1–5	21–34	5–7

[z] R: resistant; MR: moderately resistant; MS: moderately susceptible; S: susceptible; HS: highly susceptible.

‘台農育 914079 號’ 兩期作之穗上發芽率與 ‘台稉 11 號’ 同等級，均呈 1–9 級，‘越光’ 則均為 1 級；‘台農育 914079 號’ 兩期作之脫粒率也與 ‘台稉 11 號’ 相近，均呈 5–7 級，具中等脫粒性，而 ‘越光’ 則屬難脫粒性 (表 6)。

各種病蟲害抗性檢定

稻熱病抗性：於 2004、2005 年以水田式 (嘉義分所及台東縣關山鎮) 及旱田式 (嘉義分所) 病圃進行檢定，‘台農育 914079 號’ 成株之葉稻熱病抗性 (水田病圃) 具中抗 (MR)–中感 (MS)，穗稻熱病為中抗 (MR)–感 (S)，均弱於 ‘台稉 11 號’ 成株之葉稻熱病之中抗 (MR) 及穗稻熱病之抗 (R)–中抗 (MR) 表現；‘台農育 914079 號’ 秧苗期之稻熱病抗性呈中抗 (MR) – 高感 (HS)，弱於對照品種 ‘台稉 11 號’ 之抗 (R)–中抗 (MR) 表現。與 ‘台農育 914079 號’ 具有相同親緣的米質對照品種 ‘越光’ 對各類型

表 7. ‘台農育 914079 號’ 生物逆境特性檢定結果。

Table 7. Evaluation of biotic stress characters of ‘TNGY914079’ [z].

Variety (Line)	TNGY914079	Koshihikari	TK11
Blast			
Leaf	MR–MS	MS–HS	MR
Panicle	MR–S	S–HS	R–MS
Seedling	MR–HS	HS	R–MR
Bacterial blight			
XM42	MS–HS	MS–S	MS–S
XF81	S–HS	S	S
Sheath blast	S–HS	HS	S–HS
Stripe	MS–S	HS	HS
Brown planthopper			
Seedling	S	S	S
Plant	MR–S	S	S
Whiteback planthopper	MR–S	S	MR–S
Small planthopper	MR	S	S

[z] HR: Highly resistant; R: resitant; MR: moderately resistant; MS: moderately susceptible; S: susceptible; and HS: highly susceptible.

的稻熱病則均呈感 (S)–高感 (HS)，均弱於 ‘台農育914079號’。整體而言，‘台農育914079號’之稻熱病抗性不論成株或秧苗期均可達中抗之反應，雖然抗性較產量對照品種 ‘台稉 11 號’ 爲弱，但仍強於米質對照品種 ‘越光’ (表 7)。

白葉枯病抗性：經 2004、2005 年計二年四期作委由臺中區農業改良場進行白葉枯病抗性檢定，‘台農育 914079 號’ 之白葉枯病抗性對 XM-42 菌株呈中感 (MS)–高感 (HS)、對 XF-81 菌株呈感 (S)–高感 (HS)，兩對照品種對 XM-42 菌株呈中感 (MS)–感 (S)、對 XF-81 菌株則均呈感 (S) 級表現，顯示 ‘台農育 914079 號’ 與兩對照品種均不具白葉枯病之抗性 (表 7)。

紋枯病抗性：經 2004、2005 年計二年四期作委由臺南區農業改良場嘉義分場進行紋枯病抗性檢定，‘台農育 914079 號’ 及兩對照品種對紋枯病皆不具抗性，呈感 (S) 或極感 (HS) (表 7)。

縞葉枯病抗性：經 2004、2005 年第一期作委由高雄區農業改良場於室內盆栽檢定，‘台農育 914079 號’ 之縞葉枯病抗性呈中感 (MS)–感 (S)，雖優於兩對照品種之高感 (HS) 級反應，然而仍不具抗性 (表 7)。

蟲害抗性：經 2004、2005 年委由嘉義農業試驗分所進行褐飛蝨、白背飛蝨及斑飛蝨之抗性檢定，‘台農育 914079 號’ 對褐飛蝨之抵抗性，成株呈中抗 (MR)，而秧苗均爲感 (S)，對照品種 ‘台稉 11 號’ 則均爲感 (S)；在白背飛蝨的抗性表現上，‘台農育 914079 號’ 與對照品種 ‘台稉 11 號’ 均一年爲感 (S)、一年爲中抗 (MR)；在斑飛蝨的抗性表現上，‘台農育 914079 號’ 兩年均爲中抗 (MR)，對照品種 ‘台稉 11 號’ 則均爲感 (S)；米質對照品種 ‘越光’ 在各項除害檢定上則均呈感 (S)。整體而言，‘台農育 914079 號’ 對斑飛蝨呈中抗表現，略優於對照品種 ‘台稉 11 號’ 及米質對照品種 ‘越光’，但與兩對照品種皆對褐飛蝨與白背飛蝨不具抗性 (表 7)。

稻米品質分析

稻米外觀品質與理化性質分析：參加區域試驗之米質分析，不論早熟或晚熟組均以良質米品種 ‘台稉 9 號’ 爲米質對照品種，且早熟品種也將 ‘越光’ 列爲米質參考品種，以加強新品系在稻米品質評比上的可信度。經兩年四期作之米質分析結果，在容重方面，‘台農育 914079號’ 兩期作 (分別爲 574 g L^{-1}、586 g L^{-1})

均略低於產量對照品種 ‘台稉 11 號’，但比米質對照品種 ‘台稉9號’ 及早熟米質參考品種 ‘越光’ 重。碾米品質之糙米率及完整米率則與 ‘台稉 9 號’、‘台稉 11 號’、‘越光’ 相近。在米粒外觀上，‘台農育 914079 號’ 之粒長、粒形均與對照品種及參考品種相同，屬粒長短且為短圓粒形；‘台農育 914079 號’ 透明度兩期作也與對照品種及參考品種相同；‘台農育 914079 號’ 之心白、腹白、背白總和與 ‘越光’ 相近，低於 ‘台稉 9 號’，高於 ‘台稉 11 號’ 心白、腹白及背白之總和未超過 1，已達良質米之外觀評審標準。在直鏈性澱粉含量方面，‘台農育 914079 號’ 兩期作均低於 ‘台稉 11 號’，但高於 ‘台稉 9 號’ 及 ‘越光’。‘台農育 914079 號’ 兩期作之粗蛋白質含量低於對照品種及參考品種。在烹調品質方面，‘台農育 914079 號’ 與對照品種及參考品種相似，均屬低糊化溫度、軟凝膠展延性 (表 8)。

米飯之食味檢定分析：經兩年四期作煮熟米飯之品評分析結果，‘台農育 914079 號’ 二期作有一年之米飯外觀優於對照品種 ‘台稉 9 號’，但一期作有一年較 ‘越光’ 差，其餘則與對照品種及參考品種相同。香味則兩年四期作均優於對照品種及參考品種，且相較於 ‘台稉 11 號’ 及 ‘越光’ 則有口味佳、較黏且軟之表現；四期作總評表現均與 ‘台稉 9 號’ 相同，第一期作並優於 ‘台稉 11 號’，兩期作各有一年優於越光米 (表 9)。

氮肥效應試驗

經 2004、2005 年計兩年四期作在農業試驗所進行氮肥效應試驗，兩期作 ‘台農育 914079 號’ 與對照品種 ‘台稉 11 號’ 之平均稻穀產量均隨氮素用量增加而有增產之趨勢。就氮素利用效益而言，‘台農育 914079 號’ 第一、二期作各以 160 kg ha^{-1}、120 kg ha^{-1} 氮素施用量之效益最高，產量對照品種 ‘台稉 11 號’ 於兩期作均以 120 kg ha^{-1} 氮素施用量下之效益最高 (表 10)。

討論

‘越光’ 米的品質一直以來都受到日本消費者的肯定與接受，日本育種者多以改進 ‘越光’ 的各項特性為研究方向，也育成許多兼具 ‘越光’ 品質及耐逆境或高產潛能的品系，目前仍以提高食味品質為重要育種目標之一 (Ishizaki *et al*. 2005; Takeuchi *et al*. 2006)，但受限於食味品質的複雜性及再現性，使得食味品質的增進，依舊困難重重 (Sasaki 2008)。‘越光’ 品種是以 ‘農林 1 號’ 及 ‘農林 22 號’ 在 1944 年雜交選育，1956 年命名為 ‘越南 17 號’，商品名為 ‘コシヒカリ’ (‘越光) 的品種，日本農林水產省的國家品種代號為 ‘農林 100 號’，由於兩親本的食味品質並無預期可獲得如此優良的食味品質特性，卻幸運地選出優良品質的 ‘越光’ 品種 (Sasaki 2008)。其後因高產品種推出，‘越光’ 在日本栽培面積雖一度下滑，但在消費者重視米質的日本，最終還是廣受各界重視，也成為許多稉稻生產國之品種米質的重要參考指標。

國內稉稻育種上仍以達成同 ‘越光’ 在日本的一樣品質為目標，大都以 ‘越光’ 或其衍生品種為親本來改進現有推廣品種的品質，尚無利用 ‘越光’ 兩親本 ‘農林 1 號’ 及 ‘農林 22 號’ 為直接親本選育命名推廣的品種。在育種上，因氣候環境的差異性，於不同環境下分離族群的選拔效果也會有所不同，而且因氣候變遷的差異性，品種選育的持續進行，仍被認為是維持或增進稻米產量及品質的重要手段 (Stokstad 2003)。因此，農業試驗所利用這兩親本的雜交組合，在台灣高溫高濕的環境下，選育出適合台灣品栽培條件及媲美日本 ‘越光’ 品質的品種 ‘台農 77 號’。

農業試驗所自 1997 年即以 ‘農林 22 號’ 及 ‘農林 1 號’ 為親本進行雜交，剛開始建立的組合包含正反交組合 (‘農林 22 號’ × ‘農林 1 號’、‘農林 1 號’ × ‘農林 22 號’)，且在早期世代利用改良式的混合法進行遺傳質的固定，隨後再以譜系法進行篩選，就育種學的理論基礎而言，採取混合法有利於對環境適應性的品種選拔。日本品種在台灣的生育期均短，約 90–100 d，極早熟的植株產量偏低也容易遭致鳥害，因此選拔較兩親本略為晚熟的植株混合為下一世代族群繁殖，經兩次的選拔混合，並於 F_6 進入觀察試驗、初級及高級產量試驗時

表 **8.** ‘台農育 914079 號’ 區域試驗之米粒理化性質表現。

Table 8. Performance of grain physicochemical characteristics of ‘TNGY914079’ in regional yield trail[z].

	Test weight		Milling quality		Grain appearance						Cooking and eating quality			
Variety (Line)	TW ($g\ L^{-1}$)	W (%)	BR (%)	HR (%)	BRL[y]	BRS[x]	TR	WC	WY	WB	GT[w]	AC (%)	PC (%)	GC (mm)[v]
First crop season														
TNGY914079	574	14.0	82.0	67.7	5.08 S	1.6 B	3.3	0.13	0	0.53	6 L	17.4	5.6	91 S
TK9	579	14.4	81.2	66.3	5.33 S	1.7 B	3.3	0.57	0.11	0.29	6 L	16.0	5.7	92 S
Koshihikari	515	13.7	81.3	67.4	5.08 S	1.7 B	3.3	0.29	0.15	0	6 L	16.1	6.8	90 S
TK11	595	13.9	82.6	66.6	4.84 S	1.6 B	3.5	0.25	0	0.18	6 L	17.8	6.0	90 S
Second crop season														
TNGY914079	586	13.8	82.1	72.3	5.09 S	1.6 B	3.0	0.04	0.14	0	6 L	19.9	6.4	88 S
TK9	573	13.8	82.6	72.1	5.37 S	1.7 B	3.0	0.35	0.20	0	6 L	18.7	6.5	92 S
Koshihikari	514	13.9	81.5	70.2	5.09 S	1.7 B	3.0	0.14	0	0	6 L	17.0	8.2	87 S
TK11	601	14.5	83.2	72.1	5.08 S	1.7 B	3.0	0.08	0	0	6 L	20.6	7.2	94 S

[z] All trials were conducted in Tachun Chunghwai, and analyed by TADRI, in 2004 and 2005. TW: test weight; W: water content; BR: brown rice; HR: head rice; BRL: brown rice length; BRS: brown rice shape; TR: translucency; GWC: white center; GWB: white belly; GWB: white back; GT: gelatinization temperature; AC: amylose content; PC: protein content; and GC: gel consistency.

[y] VL (extra-long): more than 7.50 mm; L (long): 7.06 to 7.50 mm; M (medium): 6.101 to 6.609 mm; S (short): less than 5.51 mm.

[x] Grain length and width ratio. S (slender): over 3.0; M (medium): 2.01 to 2.99; B (bold): less than 2.0.

[w] L: low gelatinization temperature.

[v] S: soft gelatinization consistency.

表 **9.** ‘台農育 914079 號 ’ 區域試驗之食味檢定。

Table 9. Performace of palatability of ‘TNGY 914079’ in regional yield trail[z].

Variety (Line)	Appearance		Aroma		Flavor		Cohesion		Hardness		Overall	
First crop season												
TNGY914079	0.181	2B[y]	0.754	2A	-0.031	2B	-0.063	2B	0.226	2B	-0.004	2B
TK9	0	2B	0	2B	0	2B	0	2B	0	2B	0	2B
Koshihikari	0.149	1A1B	-0.032	2B	-0.216	1B1C	-0.257	1B1C	0.500	1A1B	-0.250	1B1C
TK11	0.063	2B	0	2B	-0.5	2C	-0.625	2C	0.563	2A	-0.688	2C
Second crop season												
TNGY914079	0.175	1A1B	0.813	2A	-0.068	2B	-0.094	2B	0.237	2B	-0.099	2B
TK9	0	2B	0	2B	0	2B	0	2B	0	2B	0	2B
Koshihikari	-0.044	2B	-0.100	2B	-0.325	1B1C	-0.361	1B1C	0.695	2A	-0.361	1B1C
TK11	0.040	2B	0	2B	-0.146	2B	-0.218	2B	0.370	1A1B	-0.115	2B

[z] All trials was produced in Tachun Chunghwai, analysis by TADRI, in 2004 and 2005.
[y] A: better than ‘TK9’; B: same as ‘TK9’; and C:less than ‘TK9’ in aperance, aroma, flavor characters; for cohesion,
[x] A: more hardness than ‘TK9’, B: hardness same as ‘TK9’, and C: less hardness than ‘TK9’. 1A1B represent one year is A and another year is B, 2 A represent both year are A.

表 **10.** ‘台農育 914079 號’ 與 ‘台粳 11 號’ 氮肥利用效益。

Table 10. Comparison of nitrogen use efficiency between ‘TNGY 914079’ and ‘TK11’.

Variety (Line)	Nitrogen level (kg ha^{-1})	Yield (kg ha^{-1})	Ratio (%)[z]	Nitrogen use efficiency N.T. N.T.$^{-1}$	Nitrogen use efficiency N.T. kg^{-1}
First crop season					
TNGY914079	80	5,098.2 c[w]	100	-	-
	120	5,956.3 bc	117	10.2	429.0
	160	7,119.4 ab	140	12.1	505.3
	200	7,644.1 a	150	10.1	424.3
TK11	80	4,869.7 b	100	-	-
	120	5,613.5 ab	115	8.9	371.9
	160	5,960.8 ab	122	6.5	272.8
	200	6,708.9 a	138	7.3	306.5
Second crop season					
TNGY914079	80	4,265.9 b	100	-	-
	120	4,806.5 a	113	6.4	270.3
	160	5,034.8 a	118	4.6	192.2
	200	5,545.9 a	130	5.1	213.3
TK11	80	3,244.6 b	100	-	-
	120	4,480.3 a	138	14.7	617.9
	160	4,898.9 a	151	9.9	413.6
	200	5,096.0 a	157	7.4	308.6

[z] Ratio (%): expressed as percentage of 80 kg ha^{-1} nitrogen level.
[y] Nitrogen use efficiency (N.T. N.T.$^{-1}$): (yield of treatment − yield of 80 kg N ha^{-1}) × rice price (23 NTD kg^{-1})/cost of increasing nitrogen (NTD 41.91 kg^{-1}).
[x] Nitrogen use efficiency (N.T. kg^{-1}): (yield of treatment − yield of 80 kg N ha^{-1}) × rice price (23 NTD kg^{-1})/cost of nitrogen (NTD 41.91 kg^{-1})
[w] Means within each column followed by the same letter(s) are not significantly different at 5% level by Fisher’s protected LSD test.

進行實際的食味評估。雖然於高級產量試驗中另有產量略高的品系，但仍選拔食味優良的‘台農育 914079 號’進入全國的區域試驗產量比較試驗，最後也證實‘台農育 914079 號’在品質上的優良表現，也驗證於早期世代利用混合法加以固定再進行選拔，具有對環境適應性佳的優點。

2011 年第二期作起無償提供有意願之農戶試種，以收集更多與本品種栽培、適應性、產量、品質相關的資訊，做為未來推廣時之依據。目前試種的表現，以中南部表現出產量優勢，在米質外觀、容重量及碾米率都能獲得一致的好評，但食味口感則多少因栽培管理條件之差異而有不同評語。一般而言，稻米的蛋白質含量越高，其米飯之口味、黏性、彈性及光澤等食味品質越差 (Hong *et al*. 1989)，且蛋白質含量與氮肥施用量具有明顯的正相關 (Lai *et al*. 1997)，這種現象在‘台農 77 號’於試種時得到驗證。通常以米質為導向的栽培模式，在後期氮肥施用量少的情況下，可獲得較佳的食味品質；以產量為導向的高氮肥栽培方式，相對地通常會食味變差及米飯較硬。另外，收穫時期也是影響米粒外觀、米粒中蛋白質含量及食味口感的重要因素 (Arai & Itani 2004)。因此未來針對各地區的最適肥料及收穫時期的探討，將有助於充分發揮‘台農 77 號’的優良米質特性及產量潛勢。

綜合‘台農 77 號’於區域試驗與特性檢定表現，以及目前試種的反應，說明本品種具有以下優點：(一) 米粒外觀良好、食味佳：兩期作之米粒外觀均優於米質對照品種‘台稉 9 號’，食味總評也與‘台稉 9 號’相同，且更具飯香味；(二) 稻穀產量高：兩期作的稻穀產量均與早熟對照品種‘台稉 11 號’無顯著差異，尤其以中南部更具高產之潛力；(三) 穀粒大而飽滿：兩期作之穀粒千粒重平均各較‘台稉 11 號’重 3.7 g 及 3.5 g，屬於穗重型的新品種；(四) 氮肥利用效益佳：稻穀產量隨氮肥施用量增加而遞增，每公頃氮肥施用量兩期作各 160 kg ha^{-1} 及 120 kg ha^{-1} 時的效益最高；(五) 抗倒伏性良好：兩期作在施用氮肥 200 kg ha^{-1} 下之抗倒伏性均優於‘台稉 11 號’，適合機械採收並能確保稻穀之產量及品質。但‘台農 77 號’仍有一些缺點，如成熟期較不具耐寒性，以及對部份病蟲害 (如白葉枯病、紋枯病、白背飛蝨等) 之抵抗性偏弱。

建議‘台農 77 號’的栽培管理上應注意：(一) 應朝生產良質米為目標，以發揮‘台農 77 號’的米質特色，不宜追求高產而影響其品質，尤其抽穗後應盡量減少氮肥施用，且於收穫乾燥時至少維持水分在 14.5% 左右，以獲得良好的食味品質與米飯香味；(二)‘台農 77 號’略具休眠性，第一期作收穫的新鮮稻種於育苗時，應特別注意打破休眠的處理，浸種時以活動的水流或增加每天換水次數，催芽至‘露白’方可進行播種，以增加發芽率並使秧苗發育整齊；(三)‘台農 77 號’相較‘台農 11 號’略為晚熟，但仍屬中早熟品系，田間栽培管理方式可參照一般中早熟品種進行，雖然其稻穀產量會隨氮素用量增加而遞增，但推薦第一、二期作最適的施氮量每公頃分別為 160 kg 及 120 kg 時之氮肥效益最高，而於生育初期增加氮肥施用量以提高分蘗數；(四)‘台農 77 號’的第二期作耐寒性較差，因此中部以北的水稻栽培區，第二期作應避免太晚移植，以避開抽穗時期遭受東北季風為害，造成不稔或稔實不佳；(五)‘台農 77 號’對葉及穗稻熱病的抗性表現偏弱，且對白葉枯病、紋枯病及斑飛蝨等蟲害之抵抗性仍欠理想，栽培時應注意各地區之水稻病蟲害預測情報及田間實際危害情形，給予適時、適藥、適量及適位的防治；(六) 收穫前勿過早斷水，以免影響米質，適當之斷水時間約為收穫前 7 d 左右，其他未提及之栽培管理要領，可依照一般稉稻栽培方法實施。

致謝

本品種之育成，承蒙行政院農業委員會及前農林廳經費補助，並承各試驗改良場所諸多先進協助，僅此一併深致謝忱。

引用文獻

Arai, E. and T. Itani. 2004. Effects of harvesting time on sweetness of cooked rice and activity of starch-degradation enzymes of rice grains. Food Sci. Technol.

Res. 10:282–289.

Chiu, Y. C. and C. W. Wu. 2007. Development of new rice variety Kaohsiung 145. Res. Bull. Kaohsiung DAIS. 16:1–14. (in Chinese with English abstract)

Chung, S. Y., Z. W. Wu, and C. Y. Chiu. 2008. Development of the new rice variety Kaohsiung 146. Res. Bull. Kaohsiung DAIS. 19:1–22. (in Chinese with English abstract)

Finlay K. W. and G. N. Wilkinson. 1963. The analysis of adaptation in a plant breeding programme. Aust. J. Agric. Res. 14:742–754.

Fukuoka, S., Y. Nonoue, and M. Yano. 2010. Germplasm enhancement by developing advanced plant materials from diverse rice accessions. Breed. Sci. 60:509–517. (in Japanese with English abstract)

Hong, M. C., S. Song, H. I. Liu, and L. H. Lin. 1989. Studies on the physicochemical properties of rice. I. The relation between palatability evaluations of cooked rice and grain appearance physicochemical properties of rice. Res. Bull. Taichung DAIS. 24:53–62. (in Chinese with English abstract)

Ishizaki, K., T. Hoshi, S. Abe, Y. Sasaki, K. Kobayashi, H. Kasaneyama, T. Matsui, and S. Azuma. 2005. Breeding of blast resistant isogenic lines in rice variety koshihikari and evaluation of their characters. Breed. Sci. 55:371–377. (in Japanese with English abstract)

Joshi, K. D., A. M. Musa, C. Johansen, S. Gyawali, D. Harris, and J. R. Witcombe. 2007. Highly client-oriented breeding, using local preferences and selection, produces widely adapted rice varieties. Field Crops Res.100:107–116.

Lai, M. H., C. C. Chen, Y. C. Kuo, C. G. Chern, C. P. Li, T. H. Tseng, and Y. C. Lin. 1997. The relationship between grain productivity and nitrogen-fertilizer rate of currently cultivated rice cultivars II. The effects of different nitrogen rates on volume weight and quality traits in rice. J. Agric. Res. China 46:1–14. (in Chinese with English abstract)

Lai, M. H., C. P. Li, C. S. Tseng, H. J. Hunag, C. G. Chern, and Y. C. Kuo. 2001. Development of aromatic rice variety Tainung 71 (Yihchuan aromatic rice). J. Agric. Res. China 50:1–12. (in Chinese with English abstract)

Lai, M. H., C. P. Li, C. S. Tseng, H. M. Yen, W. S. Jwo, T. H. Tseng, and C. G. Chern. 2007. Tainunug rice No. 75. A new japonica type rice variety. J. Taiwan Agric. Res. 56:79–98. (in Chinese with English abstract)

Lin, F. H. 2006. Review of breeding progress on yield, grain quality, diseases and insect pests resistance in rice and its perspective. Crop Environ. Bioinform. 3:285–296. (in Chinese with English abstract)

Lin, M. S. 1991. Genetic base of Japonica rice varieties released in Taiwan. Euphytica 56:43–46.

Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan. 1989. Characteristization of Rice, Wheat Recommended Variety. Ministry of Agriculture and Forestry Agricultural Administration Office Crop Production Division, Tokyo. 262 pp. (in Japanese)

Oosato, K. F. and T. Yashida. 1996. Coefficient of parentage in rice breeding lines and its relationship to eating quality. Breed. Sci. 46:295–301. (in Japanese with English abstract)

Sasaki, T. 2008. Good eating quality: Practically attainable but still genetically unsolved. Breed. Sci. 58:345. (in Japanese with English abstract)

Sato, H. and T. Yoshida. 2007. Pedigree analysis of rice breeding lines in Fukushima prefecture. Jpn. J. Crop Sci. 76:238–244. (in Japanese with English abstract)

Sheu, C. S. and S. Song. 1993. New japonica cultivar Taiken 9. Taichung Dist. Agric. Bull. 5:40–41. (in Chinese)

Shigemune, A., K. Miura, H. Sasahara, A. Goro, and T. Yoshida. 2010. Pedigree analysis of rice bred in Hokuriku research center. Jpn. J. Crop Sci. 75:153–158.

Stokstad, E. 2003. Study shows richer harvests owe much to climate. Science 299:997.

Takeuchi, Y., T. Ebitan, T. Yamamoto, H. Sato, H. Ohta, H. Hirabayashi, H. Kato, I. Ando, H. Nemoto, T. Imbe, and M. Yano. 2006. Development of isogenic lines of rice cultivar Koshihikari with early and late heading by marker-assisted selection. Breed. Sci. 56:405–413. (in Japanese with English abstract)

Teng, Y. C. 2003. Rice industry development and its future prospects in Taiwan. Res. Bull. Kaohsiung DAIS. 14:1–23. (in Chinese with English abstract)

Wu, W. C. and M. S. Lin. 2008. Pedigree analysis of rice varieties of Taiwan: I. Relationships among Japanese introductions. Crop Environ. Bioinform. 5:248–257. (in Chinese with English abstract)

Yamamoto, T., F. Taguchi-Shiobara, Y. Ukai, T. Sasaki, and M. Yano. 2001. Mapping quantitative trait loci for days-to-heading, and culm, panicle and internode length in a BC1F3 population using an elite rice variety, koshihikari, as the recurrent parent. Breed. Sci. 51:63–71. (in Japanese with English abstract)

Yang, J. L., C. S. Hseu, and S. J. Chung. 2005. The development of very early mature japonica rice variety Taichung 191. Res. Bull. Taichung DAIS. 86:47–62. (in Chinese with English abstract)

Development of Japonica Rice Cultivar 'Tainung77'

Charng-Pei Li[1], Hsing-Mu Yen[1], Woei-Shyuan Jwo[1], Dung-Hung Wu[1], Ching-Shan Tseng[2], Tung-Hi Tseng[3], and Ming-Hsing Lai[4,*]

Abstract

Li, C. P., H. M. Yen, W. S. Jwo, D. H. Wu, C. S. Tseng, T. H. Tseng, and M. H. Lai. 2013. Development of japonica rice cultivar 'Tainung77'. J. Taiwan Agric. Res. 62(3):235–248.

Rice quality improvement has been recognized as one of the main goals for local rice breeders in Taiwan. In order to breed a variety which is as good as Japanese 'Koshihikari' and also suitable for Taiwan's unique cultivating environment, Taiwan Agricultural Research Institute used a genetic combination of 'Norin 22 × Norin 1' since 1997. The modified bulk method was adopted in the early generations to fix the genetic settings followed by pedigree method for phenotypic selection in the breeding procedure. After the processes of observation, primary yield, and advanced yield trials, the line of 'Tainung-Yu914079' ('TNGY914079') was chosen for the early-maturity regional yield trails and various agronomic characteristics tests in 2004–2005. Results showed that the chosen line carry several superior traits, such as mid-early maturity, lodging resistance, high yield potential, and excellent performance in grain appearance and flavor. It was renamed as 'Tainung77' in 2011 and became an alternative quality rice for the market.

Key words: Japonica rice, Yield characters, Rice quality.

Received: March 25, 2013; Accepted: July 1, 2013.
[*] Corresponding author, e-mail: mhlai@tari.gov.tw
[1] Assistant Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Former Associate Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[4] Associate Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 62(3):249–258 (2013)
DOI: 10.6156/JTAR/2013.06203.05

Effects of Roasting Prior to Pressing on the Camellia Oil Quality

Ching-Ming Hsieh[1], Jeng-Chuann Yang[2], Yao-Chun Chuang[3], Eugene I-Chen Wang[4], and Ya-Lin Lee[5,*]

Abstract

Hsieh, C. M., J. C. Yang, Y. C. Chuang, E. I. C. Wang, and Y. L. Lee. 2013. Effects of roasting prior to pressing on the camellia oil quality. J. Taiwan Agric. Res. 62(3):249–258.

Oil tea camellia seed oil serves as a culinary oil in China for over two thousand years. It has many remedial functions as described in ancient Chinese medicine books, such as mitigating blood circulation, nourishing gastrointestinal tract, improving eyesight and detoxification. Camellia oils sold in Taiwan are manufactured by traditional pressing methods and without refining. Standard processing procedures include dehulling, milling and pressing. A roasting treatment can be added between the dehulling and milling stages, but little is scientifically known about its advantages or disadvantages. In this study three camellia seeds, *Camellia oleifera*, *Camellia tenuifolia* and *Camellia sinensis*, were treated to different roasting conditions at various temperatures and times. The resulting oils were analyzed with respects to acid value, peroxide value, fatty acid composition, and phenols content to investigate their quality and characteristics. Our results suggested that with adequate roasting treatments the camellia oil quality can be improved and become oxidatively more stable.

Key words: Oil tea camellia seed oil, Roasting, Oil quality, Oil oxidative stability, *Camellia oleifera*.

INTRODUCTION

Oil tea camellia seed oil, namely camellia oil, has been used as a culinary oil in Chinese family for over two thousand years. In the 'Compendium of Materia Medica' written by Shizhen Li (1518–1593 AD) the camellia oil has been touted to have functions of mitigating circulation, nourishing gastrointestinal tract, improving eyesight and detoxification (Shen *et al*. 2012). A review by Li *et al*. (2011) provided bioactivity information of camellia oils to include functions of reducing oxidation, inflammation, neoplasma, hyperlipidermia, protecting heart and liver, and improving human immunity. Camellia oils have a similar fatty acid composition as that of olive oil, high in oleic acid (C18 : 1) which could reach over 80% (Zhong *et al*. 2007). The oleic acid-rich oils have been proven to reduce blood cholesterol and the risk of cardiovascular disease (Kris-Etherton 1999). In addition to the fatty acid compositions the camellia oils possess several active ingredients other than those of olive oil, such as tea polyphenols and tea saponins (Li *et al*. 2011). So far, the most emphasized benefit of consuming camellia oils is on their ideal fatty acid composition. Whereas in a more sophisticated experiment, two lignans (one of which was sesamin) showed good anti-oxidation activities for the *Camel-*

Received: April 23, 2013; Accepted: July 22, 2013.
* Corresponding author, e-mail: ylleet@tari.gov.tw
1 Research Assistant, Division of Wood Cellulose, Taiwan Forestry Research Institute, Taipei, Taiwan, ROC.
2 Assistant Research Fellow, Botanical Garden Division, Taiwan Forestry Research Institute, Taipei, Taiwan, ROC.
3 Research Assistant, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
4 Senior Scientist & Division Chief, Division of Wood Cellulose, Taiwan Forestry Research Institute, Taipei, Taiwan, ROC.
5 Associate Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

lia oleifera oil (Lee & Yen 2006). There are still many unidentified active ingredients in the oil remain to be explored.

In Taiwan there are three categories of camellia oils in the commercial market, *Camellia oleifera*, *Camellia tenuifolia* and *Camellia sinensis*; the former two have the bioactivities described as above, the third is a byproduct of green tea plantation. *C. oleifera* is the major species of cultivation in China. *C. tenuifolia*, on the other hand, is a unique species distributed in broadleaf forests of north Taiwan, and its seed oils are considered more valuable than that of the *C. oleifera*. All three camellia oils are sold in organic shops and command substantially higher prices than other vegetable oils offered in supermarkets. The main reason people are willing to buy them is that they are claimed to have biological activities and low herbicides/artificial-chemicals contaminations. In general, all commercial camellia oils are sold as unrefined crude oils in Taiwan.

Pursuing high quality and healthy food is always the prime objective of food manufacturers. For good quality, manufacturers generally focus on good material sources which are the root of all, and then followed by good producing processes. In camellia oils production, three steps, dehulling, milling and pressing, are applied to dry camellia seeds to obtain crude oils. In order to increase yield, most manufacturers resort to steam the milled seed meals before pressing. The effect of steaming is thought to allow hot water vapor to enhance aggregation of oil droplets, expel them from tissues, and thus increase the yield. However, water content is conceivably also an acidification factor of oils as it reacts with triacylglycerols (TGs, neutral lipid, the main component of oil) to produce free fatty acids. Therefore, conversely, some manufacturers instead apply a roasting treatment after dehulling to reduce the moisture content in camellia seeds.

In this study, roasting treatment was applied at different temperatures and times to seeds. The resulting oils were analyzed with respect to their acid value (AV), peroxide value (POV), fatty acid composition, and phenols content to investigate their quality and characteristics. Oil stability was measured by the oil Rancimat method (Lampert 1999) which helps gauging the oil's resistance to oxidation and predicting oil shelf life/stability at different temperatures.

MATERIALS AND METHODS

Camellia seeds and oil pressing process

The *C. tenuifolia* and *C. sinensis* seeds were harvested from trees grown in northern Taiwan, and *C. oleifera* seeds were harvested at the same time from a Mainland China source. The seeds were dried in a shade at room temperature, and the hulls and kernel shells were then removed. The kernels were roasted with a coffee bean roaster (ET-2, Xiong-Bang Ltd., Taoyuan, Taiwan) at temperatures of 110, 120 and 130℃ for 5, 10 or 15 min. Briefly, each roasting treated about 300 g kernels which were placed into the roaster when the pre-set temperature was reached. The temperature would decrease temporarily because of the kernel loading, but return to the pre-set temperature within 3 min, and then the timer started the countdown. The unroasted kernels served as the control set. After cooling to room temperature, the kernels were pulverized with a pulverizing machine (RT-08, Rong Tsong Precision Technology Co., Taichung, Taiwan). The pulverized meals were sieved with a 10 mesh sieve and then wrapped in two layers of cloth. An oil presser (Golden Flower Tea Oil Production Co., Miaoli, Taiwan) was used following a pressure program of 600 psi for 11 min, 1,000 psi for 40 min, and 2,800 psi for 15 min. Pressing was done at room temperature. Each pressing treated about 1 kg of kernel meals, and the yield was calculated by subtracting the weight of oil cake (including the cloth) after pressing from the original weight and dividing by the latter.

Acid value and peroxide value

Acid value is the amount of carboxylic acid in oil which can be neutralized with potassium hydroxide (KOH). An autotitrator 785 DMP Trino (Metrohm, Switzerland) was used to determine the acid value of the oils following the instruction of the instrument. In which, about 2 g of oil dissolved in 50 mL of solvent (toluene : isopropanol : dd H_2O = 500 : 495 : 5) was titrated with tetrabutylammonium hydroxide (0.1 M in isopropanol : methanol = 2 : 1, v/v, 35435 Fluka, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO). Oil peroxide value (POV) was determined according to the AOCS Official Method 965.33, but the oils weights were reduced to 2.50 g, a half of the standard method.

Fatty acid composition

The oil samples were first derived with methanol to form fatty acid methyl esters (FAME). In which, one drop of oil (ca. 0.015 g) was dissolved in 1 mL *n*-hexane (containing internal standard 3.0 mg methyl heptadecanoate, Sigma-Aldrich), added with 60 μL of 2 N KOH (in methanol), vigorously shaking for 10 min on a Vortex shaker. The reaction was stopped by adding 0.4 mL saturated sodium chloride solution (36 g dissolved in 100 mL dd H_2O). The mix-

ture was then centrifuged at 12,000 × *g* for 2 min to separate the *n*-hexane and aqueous (containing methanol) layers. The *n*-hexane layer was filtered with 0.45 µm PVDF filter (Millex-HV, Millipore, Darmstadt, Germany) and diluted 100 folds and then injected to a gas chromatography coupled to a mass spectrometry (GC-MS) analysis (Varian CP-3800 GC, MS 4000, Palo Alto, CA). The separation column was CP8822 (Vf-23ms 30 M × 0.25 mm, ID DF = 0.25, Varian), and the injector temperature was set at 240℃, the helium carrier gas flow rate was set at 1 mL min^{-1}, with a split ratio of 100：1. The oven temperature program was as follows: 1 min at 100℃, 15℃ min^{-1} to 185℃, and 8 min at 185℃. One µL of the sample was injected. The standards references were the Supelco FAME Chemical Standards (Sigma-Aldrich).

Total phenols

The method of Singleton & Rossi (1965) was modified for the oil samples. Firstly, the samples were mixed with isopropanol (1：1, v/v), and then a 15-µL of the mixture was added to 240 µL distilled water, 15 µL Folin-Ciocalteau's phenol reagent (Sigma Co.) and 30 µL 35% $Na_2CO_{3(aq)}$ (Sigma Co.). After vigorous vortexing, and centrifuging at 13,000 rpm for 2 min, undissolved oil floating to the meniscus was withdrawn, and a 200-µL aliquot was used for the absorbance measurement at 750 nm, each sample in triplicates. Gallic acid (GA) (Sigma Co.) as a standard was dissolved in distilled water at concentrations of 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 mg mL^{-1}.

Oil stability

Oil stability index (OSI) assay was conducted to measure the oil stability. OSI is the time in hours of an oil sample reaching maximum change in conductivity during oxidation at 110 or 130℃. The change was caused by the production of deteriorated, volatile organic compounds (Lampert 1999). This method can be applied for comparing stabilities of parallel oil samples and predicting their stable periods at various temperatures. The oil deteriorating reaction can deduce the equation $t = A \times e^{(B \times T)}$ (where *t* is heating temperature, *T* is time of OSI, *A* and *B* are derived from experimental data). With continuous aeration, oil oxidation is accelerated, and the predicted stable periods can be considered as the 'shortest' ones, since ordinarily oil is not aerated in usage.

A Rancimat apparatus (873 Biodiesel Rancimat, Metrohm AG, Switzerland) was used for the analysis. Each 3.00 g of oil sample was tested at a set of testing temperatures of 120, 130 and 140℃, with continuous aeration at 10-L h^{-1} air flow. The effluent gas led into a test cup containing 60 mL of distilled water was monitored for electrical conductivity (EC) during the entire process. To predict oil stable period at different temperatures, a line equation was deduced from the temperature set (120, 130 and 140℃). Its regression coefficient *r* must be higher than 0.9 for the predicted stable period to be considered reliable.

RESULTS

Roasting of camellia seeds－observation and yield

Seeds of the three kinds of camellia, *C. tenuifolia*, *C. oleifera* and *C. sinensis*, were subjected to different roasting temperatures (110, 120 or 130℃) and times (5, 10 or 15 min) combinations. The roasting treatment slightly reduced their water contents. The most vigorous treatment (130℃ for 15 min) reduced the water content the most, about 5% (data not shown), and its resultant oil was the most viscous one compared to the others. Their oil yields are shown in Fig. 1. The roasting characteristics of the former two camellia oils were similar, and their yields were markedly higher than the last. The roasting treatments slightly reduced the yield of *C. tenuifolia* and *C. oleifera* oils; with about a 4% decrease in samples roasted at the highest temperature. The *C. sinensis* showed a gradual and marked decreasing trend with the roasting temperature and the yields decreased from unroasted 20% to only 9%. The average yields of *C. tenuifolia*, *C. oleifera* and *C. sinensis* were 35.6, 33.6 and 12.4 g 100 g^{-1} of kernels, respectively (Table 1).

Acid value and peroxide value

Acid value (AV) is an important indicator of oil quality, and it is defined as the amount of mg KOH used to neutralize free fatty acids in 1 g of oil. Water, acid and base in the oil and ambient temperature are the main factors in oil deterioration, known as 'rancid', which can occur in the processes of manufacturing, storage and cooking. Many countries have their own regulations for edible oil merchandise. For refined oils the regulation is much more restrict than those directly pressed (crude oils). In Taiwan, acid values of refined oils are varied but all must be lower than 0.6 (mg KOH g^{-1} oil); and for pressed oils, the values for peanut oil is 2.0, and the sesame oil is 4.0. All the assayed oil samples were less than 1.0, except for unroasted *C. oleifera* oil (AV 1.2, Fig. 2). Comparatively, the AV variations in *C. oleifera* oils were larger than those in the other two camellia oils. The average AVs of *C. tenuifolia*, *C. oleifera* and *C. sinensis* were 0.50, 0.78 and 0.66, respectively (Table 1).

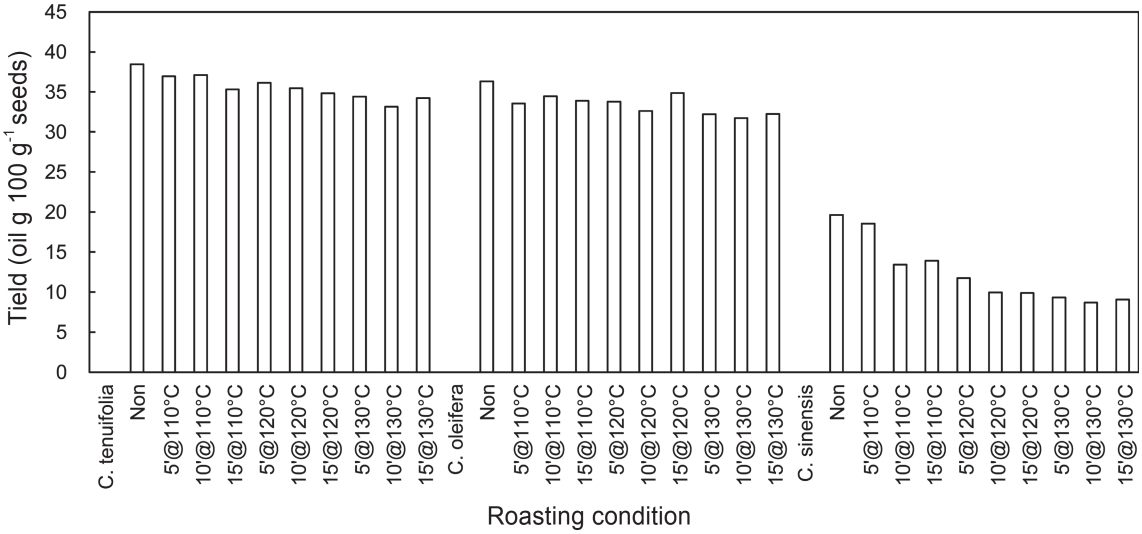

Fig. 1. Yields of three kinds of camellia oils with different roasting conditions.

Table 1. Comparison of three kinds of camellia oils on yields and some characteristics.

AVG ± SD[z]	*Camellia tenuifolia*	*Camellia oleifera*	*Camellia sinensis*
Yield	35.61 ± 1.57	33.57 ± 1.42	12.42 ± 3.95
AV	0.50 ± 0.05	0.78 ± 0.21	0.66 ± 0.03
POV-1	9.42 ± 2.67	4.32 ± 0.92	2.72 ± 3.03
Roasted only	9.77 ± 2.57	4.31 ± 0.98	1.83 ± 1.21
POV-2	10.04 ± 3.01	4.83 ± 1.08	3.13 ± 4.31
Roasted only	10.34 ± 3.04	4.77 ± 1.12	1.77 ± 1.50

[z] AVG ± standard deviation. Units: yield, g oil 100 g^{-1} kernels; AV, mg KOH g^{-1} oil; POV, meq peroxide kg^{-1} oil.

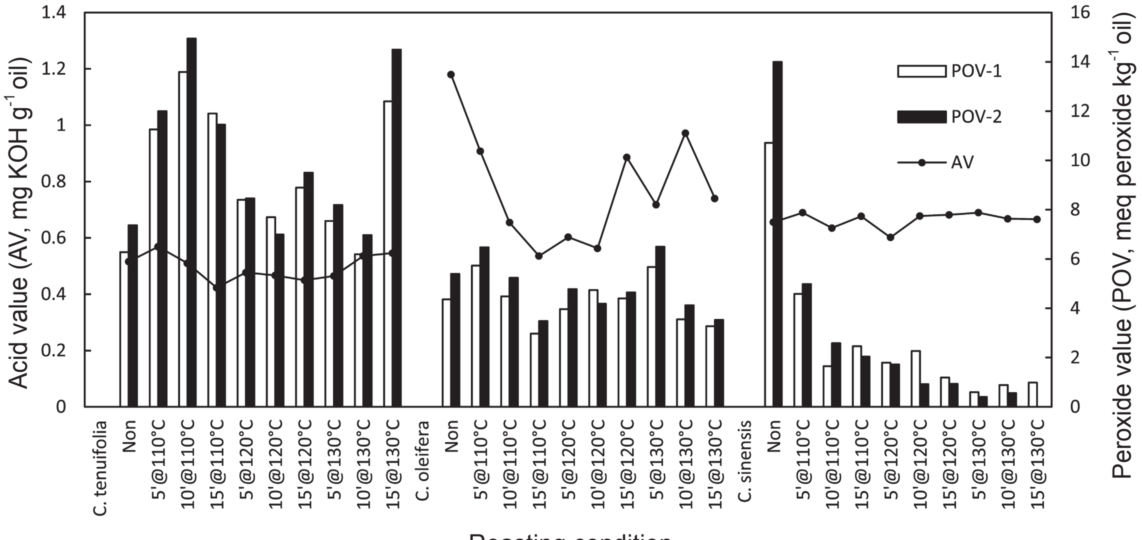

Fig. 2. Acid values (AV) and peroxide values (POV) of three kinds of camellia oils with different roasting conditions.

Peroxide value (POV) is another important indicator of oil quality. In Taiwan the POVs of some refined vegetable oils, such as peanut oil and rice bran oil, are limited to below 20 meq peroxide kg^{-1} oil. All the tested oils were below the limit (Fig. 2). The camellia oil samples were stored at 4℃ for indefinite periods. The POV-1 was determined after 5 months storage and POV-2 after 7 months. Roasting treatment effectively improved the quality of *C. sinensis* oils. The condition of roasting at 110℃ for 5 min produced POV-1 and -2 of 4.6 and 5.0, respectively; less than halves of the unroasted oils (10.7 and 14.0, respectively). At the highest treatment temperature of 130℃ for 5–15 min, their POVs were decreased to less than 1.0. For *C. oleifera* oils, their POVs (Fig. 2) were very consistent with different roasting conditions including the unroasted. On the contrary, *C. tenuifolia*'s POVs were quite fluctuant, initially increasing and later decreasing with the intensity of the roasting conditions, but at the highest and longest treatment, sharply increased (130℃ for 15 min, POV-1 and -2, 12.4 and 14.5, respectively). Therefore, the roasting treatments did not show a conclusively good influence on *C. tenuifolia* and *C. oleifera* oils. For the three camellia oils, their average POVs (POV-1 and -2) sequence were *C. tenuifolia* (9.42 and 10.04) > *C. oleifera* (4.32 and 4.83) > *C. sinensis* (2.72 and 3.13) (Table 1). All were substantially less than the requirement of 20, and the 2-month storage period tended to increase the POV by about 0.5–0.6.

Fatty acid composition

Fatty acid compositions of the three camellia oils roasted at different conditions are shown in Fig. 3. Table 2 shows their average and standard deviation values calculated from all conditions including the unroasted. Most of the standard deviations were less than or close to 10% of the averages, except for the plamitic acid (C16 : 0, 13% ± 3.0%) in the *C. sinensis* oils. The palmitic content of this oil can be separated into two groups: one with ca. 16% for treatment intensity of < 120℃ for 5 min; and the other with ca. 10% for treatment intensity > 120℃ for 10 min. This indicated that the roasting treatment did not affect the fatty acid compositions of *C. tenuifolia* and *C. oleif-*

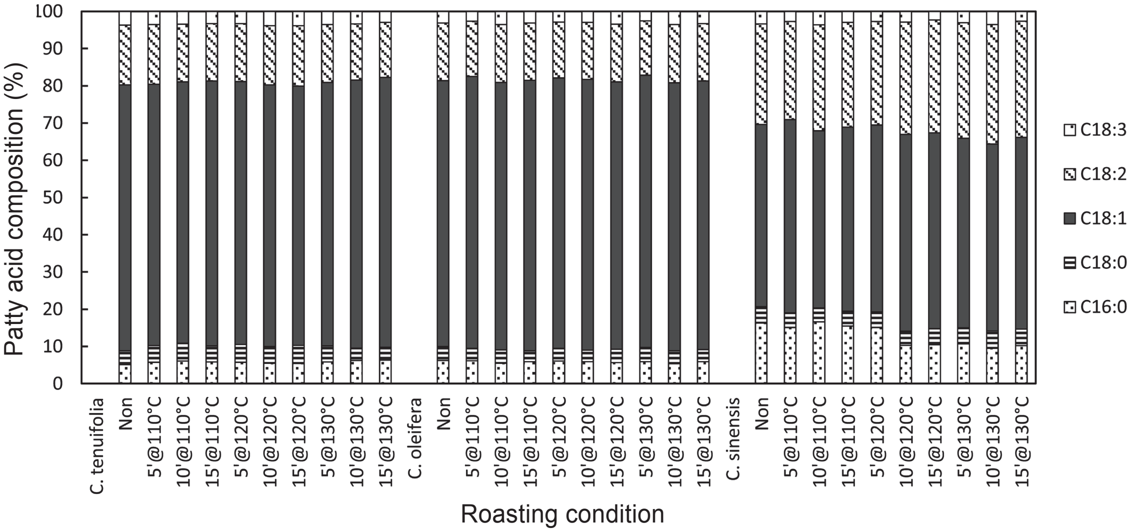

Fig. 3. Fatty acid compositions of three kinds of camellia oils with different roasting conditions.

Table 2. Average fatty acid composition of three kinds of camellia oils[z].

FA (%)	C16 : 0	C18 : 0	C18 : 1	C18 : 2	C18 : 3
Camellia tenuifolia	5.8 ± 0.4	4.3 ± 0.5	70.9 ± 0.9	15.6 ± 0.5	3.4 ± 0.3
Camellia oleifera	5.9 ± 0.3	3.4 ± 0.3	72.4 ± 0.6	15.3 ± 0.4	3.1 ± 0.4
Camellia sinensis	13.0 ± 3.0	4.2 ± 0.3	50.6 ± 1.7	29.3 ± 2.0	2.9 ± 0.4

[z] Value of fatty acid composition is mean ± standard deviation, calculated from all data including roasted sample.

era, but slightly altered the *C. sinensis* oil. The compositions of *C. tenuifolia* and *C. oleifera* were similar, having oleic acid content of 70.9% and 72.4%, respectively. Oleic acid content of *C. sinensis* oil was comparatively less, only 50.6%. The second main oil component was linoleic acid (C18 : 2), accounting for 15.6, 15.3 and 29% in the oils of *C. tenuifolia*, *C. oleifera* and *C. sinensis*, respectively. All three oils had about 3% linolenic acid (C18 : 3).

Phenols contents

Phenols are a structural category of chemical molecules bearing aromatic group(s) and having at least one hydroxyl group bonded to the benzene ring. Phenols contents of the three oils increased following the intensity of roasting conditions. At the most intense treatment (130℃ for 15 min), the phenols contents of *C. tenuifolia*, *C. oleifera* and *C. sinensis* were 3.1, 1.7 and 2.7 times of those unroasted counterparts, respectively (Fig. 4).

Oil stability index

Oil stability index (OSI, t, in h) follows the changes of tested temperature (T, in ℃) with an equation $T = \ln(t)/B - \ln(A)/B$, A and B coefficients resulted from the experimental data. Samples from the three camellia oils roasted at 110, 120 and 130℃ for 10 min and 130℃ for 15 min were analyzed (Fig. 5). The OSI approximately follows a Q_{10} temperature coefficient, i.e., the oxidation rate doubles at every 10℃ increment. Semi-logarithmic plots of all samples were prepared by setting $\ln(t)$ (x-axis, logarithmic scale) and T (y-axis), which produced linear regression lines with $r > 0.99$ (data not shown).

Comparing all unroasted samples, the *C. oleifera*'s oil was the most stable one, with OSIs of 8.0, 4.4 and 2.4 h at 110, 120 and 130℃ , respectively (the data below follow the same sequence). The OSIs of *C. tenuifolia* (5.6, 3.2 and 1.9 h) and *C. sinensis* (5.8, 2.9 and 1.5 h) were quite similar.

Compared to the unroasted, the OSIs of *C. tenuifolia* oil roasted at 110℃ for 10 min decreased (4.7, 2.7, 1.6 h), but increased for roasting at 120℃ (6.7, 3.7, 2.2 h) and 130℃ (6.6, 4.2, 2.2 h) for 10 min; however, the one roasted at 130℃ for 15 min again decreased (4.9, 2.8, 1.4 h) to similar values of that at 110℃ for 10 min. For the oils of *C. oleifera*, the OSIs increased following the roasting intensity to reach the highest values (13.5, 7.0, 3.6 h), which were also the highest among all the tested samples. For *C. sinensis* oils the best roasting condition was observed at 130℃ for 10 min (OSIs 10.8, 5.3, 2.6 h). These results indicated that the roasting treatments effectively improved oil oxidative stability, except in the case of *C. tenuifolia* oil roasted at 110℃ for 10 min.

Stable periods of the oils predicted with OSIs

The predicted stable periods of camellia oils at 4 and 25℃ are shown in Fig. 6. The roasting treat-

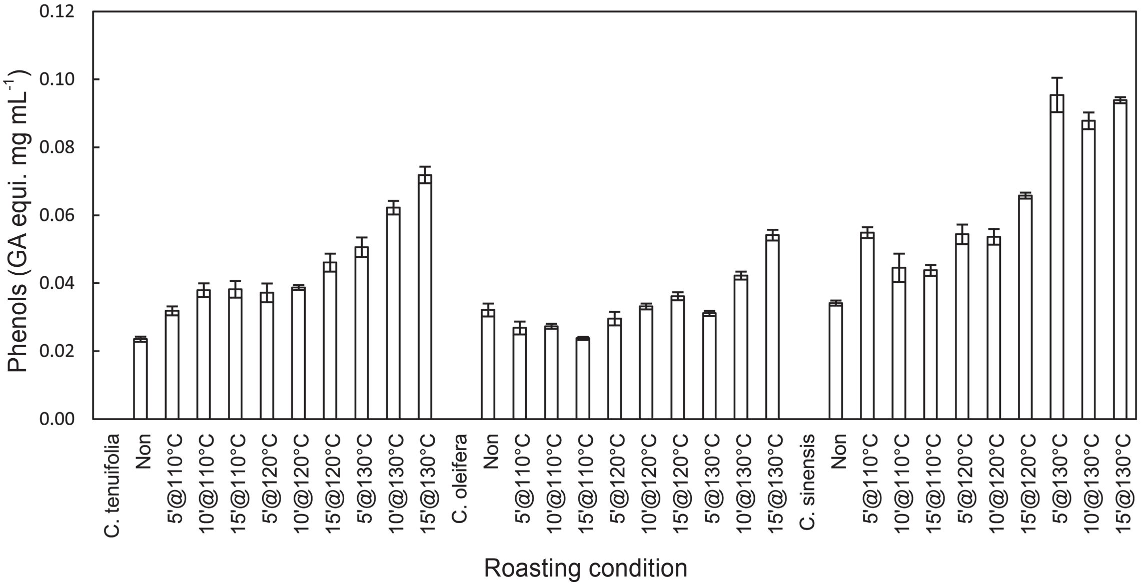

Fig. 4. Phenols contents of three kinds of camellia oils with different roasting conditions.

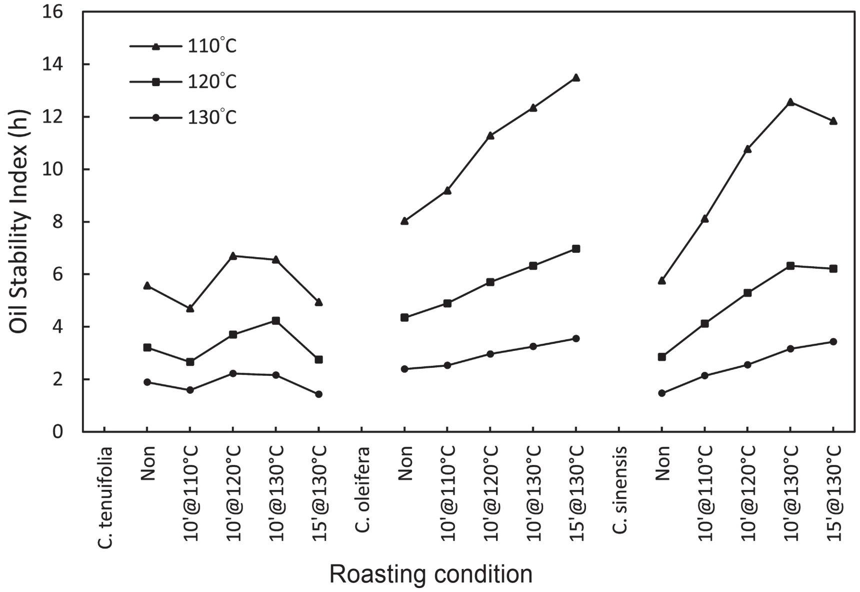

Fig. 5. Oil stability index (OSIs) of three kinds of camellia oils with different roasting conditions.

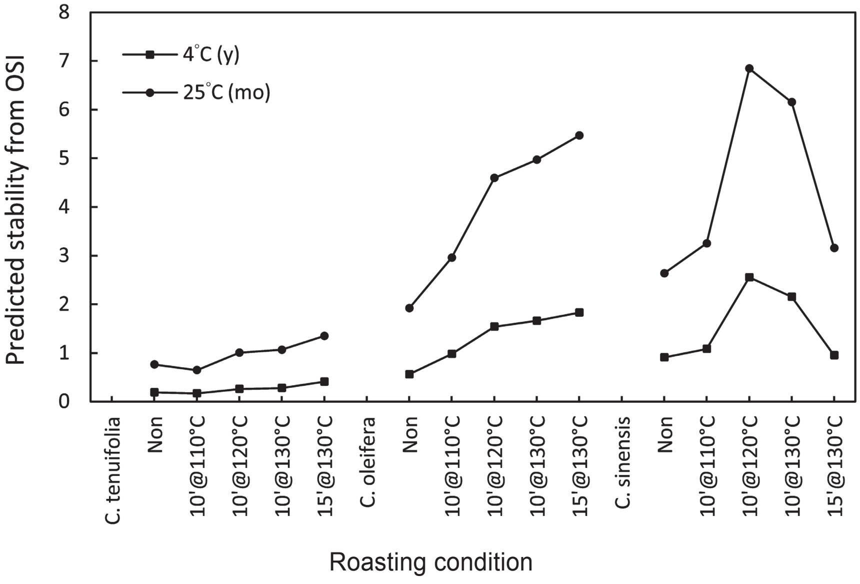

Fig. 6. Predicted oil stability of three kinds of camellia oils with different roasting conditions at temperatures 4℃ (year) and 25℃ (month).

ments exhibit good influences on the *C. tenuifolia* and *C. oleifera* oils, as all OSIs are higher than those of unroasted. Conversely, in *C. sinensis* oil, the longest stable period was obtained at the treatment of 120℃ for 10 min (the longest among all the samples), but the periods slightly decreased at 130℃ for 10 min and dramatically decreased at 130℃ for 15 min.

DISCUSSION

Roasting effects on oil yield and quality

The reasons of yield decreases may be compli-

cated. In plant seeds, TGs (oil) is stored in oil bodies enclosed by a layer composed of phospholipids and protein oleosin (Tzen & Huang 1992). The roasting process provided heat to denature protein, change TGs polymorphism (Murano 2003), and possibly resulted in reduced oil yields. The viscosity of oils increased with increasing intensities of roasting. This suggested that some alterations or interactions of ingredients occurring during the roasting process. Yield decrease by one-half in the *C. sinensis* oils suggested that there were alterations inside the tissue to hamper oil out-flow. Therefore, roasting treatment is not recommended in handling the *C. sinensis* seeds.

On the other hand, the roasting treatment did not conclusively affect the AV and POV of *C. tenuifolia* and *C. oleifera* oils, while it reduced the POV of *C. sinensis* oil. This indicated that roasting induced some physiochemical changes in *C. sinensis* oil which are beneficial to oxidation resistance. Another important indicator for oil utilization is smoke point (SP). Oils with high SP means their TGs are not degraded and have low contaminants. All the tested camellia oils bearing high SPs (avg. > 200℃ , data not shown) were not affected by the roasting treatments, and are considered as stable oils and suitable for cooking, especially when compared to many unrefined vegetable oils (such as corn, soybean and safflower oils). All the tested oil samples had AVs and POVs less than the general regulation limit for vegetable oils. These suggest that proper selection of camellia seeds materials and good processing procedures are the key to produce high quality oils.

Roasting effects on oil characteristics －FA composition and phenols contents

Roasting treatments did not affect the FA compositions of *C. tenuifolia* and *C. oleifera*. Their oleic acid (C18 : 1) content were less than 75%, slightly less than that reported (ca. 80%, Zhong *et al*. 2007). A possible reason is that the seeds might not be fully mature when harvested (Luo *et al*. 2012). The decrease in palmitic acid (C16 : 0) content of *C. sinensis* oils (from 16% decreased to 10%), however, may in part due to the roasting treatment (Fig. 3). Saturated fatty acids (such as plamitic acid) generally have higher melting points and are prone to form lipid crystals in bulk oil. Heating melts lipid crystals and may form new crystal forms after cooling which is related to the polymorphism of the TGs (Nawar 1996). Plausibly, the roasting procedure provided the melting energy, and upon recooling, the *C. sinensis* oil formed more new lipid crystals than did the other two camellia oils. Because our pressing system did not introduce heat (cold pressing), the lipid crystals in the *C. sinensis* thus were trapped in tissues and the oil yields significantly decreased, and the pressed oil contained less palmitic acid as a consequence.

Phenol contents in the three oils increased after roasting. In the *C. tenuifolia* and *C. sinensis* oils the increases were more notable than that did in the *C. oleifera* oil. Heat treatments have been reported to increase the phenols content of citrus peel extract, with an accompanying improvement in the antioxidant activities (Xu *et al*. 2007). Therefore, it is suggested that roasting treatments of the camellia oil seeds might augment detectable phenols which exerted their antioxidant activities on oils and thus increased their stability. The mechanism may be that some simpler phenols were derived from cleavage of the larger polyphenols (such as lignin) and bore more functional groups, such as hydroxyl groups on the aromatic rings, which displayed higher antioxidant activity. In a nutritional perspective, plant polyphenols have been proven to be a good source of human diet that is healthful and help prevent disease (Scalbert *et al*. 2005; Pandey & Rizvi 2009). This suggests that suitable roasting treatments of the camellia oil seeds may yield higher health values to humans.

Roasting effects on oil stability

In the OSI analyses, *C. oleifera* oils exhibited increased stability with the increasing roasting intensities (Fig. 5). The *C. sinensis* oils showed a similar trend except at the most intense roasting condition (130℃ for 15 min). On the contrary, the oils of *C. tenuifolia* were more stable at treatment temperatures of 120 and 130℃ for 10 min, which was inconsistent to the phenols content, but rather akin to the inverse POVs pattern (Fig. 2). Oil with higher POV is deemed to be of lower quality. The highest POVs were observed in the *C. tenuifolia* oil roasted at 110℃ for 10 min and 130℃ for 15 min. These were the same samples with the lowest OSIs. Possibly, there is a relationship between POV and OSI values; however, this relationship eludes observed on the oils of *C. oleifera* and *C. sinensis*.

Fig. 6 shows the predicted oil stability that is applicable to oil storage. The improvements exerted by the roasting treatment on oil stability were most notable in the *C. oleifera* oil, and followed by the *C. sinensis* and *C. tenuifolia* in a decreasing order. Different conditions of the roasting treatment appeared to produce different results for the oil samples. The treatment at 130℃ for 10 min increased twice the stable periods of the unroasted oils of *C. oleifera* and

C. sinensis. This condition could be the best treatment for the camellia oils (the stability of *C. tenuifolia* oil also improved with this treatment).

Possible reasons for the oil stability increases with roasting treatment might involve augmentation of phenolic content, as mentioned above, and the inhibition of enzymes in the seeds. Lipase, peroxidase (POD) and lipoxygenase (LOX) might be the three key enzymes affecting stability of pressed oil. Megahed (2011) found wheat lipases could be inhibited by 70℃ heating for 30 min and that AV of the resulting oil reduced. Rodriguez-Saona *et al*. (1995) inactivated the POD and LOX enzymes of sweet corn by steam blanching and found that the polyunsaturated fatty acids did not change during 9 month of storage at -20℃ but those in the control sets showed reductions. Therefore, roasting treatments of the camellia oil seeds might inactivate these enzymes and stabilize the oil.

CONCLUSIONS

The roasting treatments in this study increased the phenols contents and oil stability, but did not conclusively alter the oils' acid value and peroxide value. As for FA compositions, only palmitic acid contents in the *C. sinensis* oils slightly decreased. The oil yields decreased to different extents depending on the intensity of the roasting treatments. Therefore, we suggest that a best roasting condition shall be determined before undertaking mass production to obtain optimal results for both oil quality and quantity.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by the Council of Agriculture (101AS-1.1.2-FI-G1), Taiwan, ROC.

REFERENCES

Kris-Etherton, P. M. 1999. Monounsaturated fatty acids and risk of cardiovascular disease. Circulation 100:1253–1258.

Lampert, D. 1999. High-stability oils: What are they? How are they made? Why do we need them? p.238. *in*: Physical Properties of Fats, Oils, and Emulsifiers. (Widlak, N., ed.) AOCS Press. Champaign, IL. 260 pp.

Lee, C. P. and G. C. Yen. 2006. Antioxidant activity and bioactive compounds of tea seed (*Camellia oleifera* Abel.) oil. J. Agric. Food Chem. 54:779–784.

Li, H., G. Y. Zhou, H. Y. Zhang, and J. A. Liu. 2011. Research progress on the health function of tea oil. J. Med. Plants Res. 5:485–489.

Luo, F., X. Fei, X. Fang, J. Wang, and Y. Wang. 2012. Effects of process methods on physicochemical property and nutrient content of camellia seed oil. Acta Agric. Univ. Jiangxiensis 34:87–92. (in Chinese with English abstract)

Megahed, M. G. 2011. Study on stability of wheat germ oil and lipase activity of wheat germ during periodical storage. Agric. Biol. J. Nor. Amer. 2:163–168.

Murano, P. S. 2003. Understanding Food Science and Technology. Wadsworth, Thomson Learning, Belmont, CA. 449 pp.

Nawar, W. W. 1996. Lipids. p.241–248. *in*: Food Chemistry. (Fennema, O. R., ed) 3rd ed. Marcel Dekker Inc. New York, NY. 1069 pp.

Pandey, K. B. and S. I. Rizvi. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. Oxid. Med. Cell Longev. 2:270–278.

Rodriguez-Saona, L. E., D. M. Barrett, and D. P. Selivonchick. 1995. Peroxidase and lipoxygenase influence on stability of polyunsaturated fatty acids in sweet corn (*Zea mays* L.) during frozen storage. J. Food Sci. 60:1041–1044.

Scalbert, A., C. Manach, C. Morand, C. Rémésy, and L. Jiménez. 2005. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 45:287–306.

Shen, J., Z. Zhang, B. Tian, and Y. Hua. 2012. Lipophilic phenols partially explain differences in the antioxidant activity of subfractions from methanol extract of camellia oil. Eur. Food Res. Technol. 235:1071–1082.

Singleton, V. L. and J. A. Rossi. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Amer. J. Enol. Vitic. 16:144–158.

Tzen, J. T. and A. H. Huang. 1992. Surface structure and properties of plant seed oil bodies. J. Cell Biol. 117:327–335.

Xu, G., X. Ye, J. Chen, and D. Liu. 2007. Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. J. Agric. Food Chem. 55:330–335.

Zhong, H., D. R. Bedgood Jr., A. G. Bishop, P. D. Prenzler, and K. Robards. 2007. Endogenous biophenol, fatty acid and volatile profiles of selected oils. Food Chem. 100:1544–1551.

茶籽榨油前炒培處理對油品之影響

謝靜敏[1] 楊正釧[2] 莊曜駿[3] 王益真[4] 李雅琳[5,*]

摘要

謝靜敏、楊正釧、莊曜駿、王益真、李雅琳。2013。茶籽榨油前炒培處理對油品之影響。台灣農業研究 62(3):249–258。

中國使用茶籽油作為食用油，已經超過 2000 年的歷史了，許多古代藥典中均有記載茶籽油的功效，例如幫助血氣運行、滋養胃腸、改善視力以及解毒等等。台灣茶籽油的製程，是使用傳統壓榨法、沒有經過精煉，其標準製程包括去殼、磨碎及壓榨。在去殼與磨碎之間，可以加入炒培處理，但是其優缺點並無科學實證。本研究使用三種茶籽，大果油茶 (*Camellia oleifera*)、小果油茶 (*Camellia tenuifolia*) 及一般茶樹 (*Camellia sinensis*)，以不同的炒培溫度與時間處理，研究其榨出油的品質與特徵。分析酸價、過氧化價、脂肪酸組成，以及酚類化合物的含量，並且分析其油脂氧化安定性。結果顯示，運用合宜的炒培處理，可以有效提高油脂的品質與氧化安定性。

關鍵詞：茶籽油、炒培、油脂品質、油脂氧化安定性、大果油茶。

投稿日期：2013 年 4 月 23 日；接受日期：2013 年 7 月 22 日。

* 通訊作者：ylleet@tari.gov.tw
1 農委會林業試驗所木材纖維組研究助理。台灣 台北市。
2 農委會林業試驗所植物園組副研究員。台灣 台北市。
3 農委會農業試驗所生物技術組研究助理。台灣 台中市。
4 農委會林業試驗所木材纖維組研究員兼組長。台灣 台北市。
5 農委會農業試驗所生物技術組副研究員。台灣 台中市。

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 62(3):259–267 (2013)
DOI: 10.6156/JTAR/2013.06203.06

緩衝區設置對基因轉殖水稻花粉媒介基因流佈之影響

曾清山[1] 林彥蓉[2] 關政平[1] 賴明信[3] 吳明哲[4,*]

摘要

曾清山、林彥蓉、關政平、賴明信、吳明哲。2013。緩衝區設置對基因轉殖水稻花粉媒介基因流佈之影響。台灣農業研究 62(3):259–267。

本研究利用 2 個水稻品種，轉殖植酸酵素水稻 (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*; AAN) 作為花粉貢獻親，台農糯 73 號 (*O. sativa* L. *ssp. japonica* cv. 'Tainung73'; 'TNGW73') 作為花粉接受親，進行緩衝區設置影響對基因轉殖水稻花粉流佈之田間評估，以瞭解基因轉殖水稻在商業化生產種植前，對目前之水稻耕作系統有無影響。在有無緩衝區設置對水稻花粉流佈之評估試驗中，顯示有無緩衝區設置的效果受到距離及風向所影響。在順風狀況下，位於下風南方與東南方 7 m 之內，有無緩衝區設置對花粉流佈頻率差異不大，然而在 9 m 處其花粉流佈頻率有顯著的差別。緩衝區設置南方與東南方 9 m 處的花粉流佈頻率分別為 0.83% 和 0.84%，而無緩衝設置則分別為 1.53% 和 1.65%。在逆風狀況下，位於上風北方與東北方 1、3 和 5 m 處有緩衝區設置的花粉流佈頻率高於無緩衝區設置，但在 7 m 以後有緩衝區設置的花粉流佈頻率則明顯低於無緩衝區設置，顯示在上風處之風速較小的情況下，7 m 的緩衝區設置可減少花粉流佈頻率。

關鍵詞：基因轉殖水稻、花粉媒介基因流佈、緩衝區。

前言

自 1996 年基因轉殖作物商業化種植以來，隨著轉殖技術日漸成熟，不論作物種類、栽培面積及種植國家都逐年增加，到 2012 年國際間種植基因轉殖作物面積已達 1.7 億公頃 (James 2012)。然而各界對於基因轉殖作物及其產物在人畜食用安全性、基因污染及其他層面的生態環境安全問題仍存有疑慮，亟需在推廣基因轉殖作物前進行相關的科學評估與研究，讓公眾瞭解基因轉殖作物在生態環境中可能造成的風險，並使其風險降至最低 (Chandler & Dunwell 2008)。

基因轉殖水稻環境釋放可能帶來的生態風險和環境問題一直受到各國生態學家的關注，其中藉由花粉所引起的基因流佈問題最引人注目。在過去十多年間，許多研究人員利用栽培稻、紅米 (red rice, *Oryza sativa* L.) 及野生稻 (*Oryza rufipogon*) 爲材料，以不同種植距離來探討水稻的花粉媒介基因流佈程度，藉以估算基因流佈的頻率。結果顯示基因流佈頻率從栽培種水稻至野生稻及紅米分別爲 1.21–2.94% 及 0.011–0.046%，最遠距離在 250 m 處，仍然發現雜交種子 (Song *et al*. 2002, 2004; Lu *et al*. 2003; Messeguer *et al*. 2004; Chen et al. 2004; Wang *et al*. 2006)。。

降低花粉基因流佈之方法主要在阻斷基因交流的過程，目前在商業生產上，控制花粉基因流佈最簡單的措施是利用距離來進行隔離及調整作物開花期。各國政府爲防止基因轉殖作物與一般作物之間的雜交及混雜，訂定基因轉殖作物種植管理規範。對於隔離距離的制訂，

投稿日期：2013 年 6 月 3 日；接受日期：2013 年 7 月 31 日。
[*] 通訊作者：wu@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 國立台灣大學農藝學系副教授。台灣 台北市。
[3] 農委會農業試驗所作物組副研究員。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所生物技術組研究員兼組長。台灣 台中市。

各國依不同作物訂定參考隔離距離。歐盟地區依國家不同訂定相關法定隔離距離，玉米爲 25–200 m、甜菜 50–2,000 m、馬鈴薯 2–50 m、油菜 500–3,000 m。中國大陸在農業生物基因工程安全管理實施辦法中明訂水稻的隔離距離爲 100 m、玉米 300 m、大豆 100 m、棉花 150 m、油菜 1,000 m。日本水稻的隔離距離爲 30 m、大豆 10 m、玉米 600 m、油菜 600 m，北海道因地域關係另外訂定的隔離距離水稻爲 300 m、大豆 20 m、玉米 1,200 m、油菜 1,200 m (MAFF Guideline)。依據 '臺灣地區農作物種苗檢查須知'，主要作物生產栽培皆有訂定隔離距離，如水稻 3 m、大豆 3 m、玉米 300 m、馬鈴薯 200 m。隔離距離之制訂一般是根據作物種類及授粉距離而定，然而授粉距離受到很多因素之影響，例如風力、風向、氣溫、濕度、昆蟲地域性、栽種面積等，相關研究顯示利用距離隔離並不能充分防止基因轉殖作物的基因流佈，因此引作他用時其安全及實用性尚需進一步進行檢證 (Remund *et al*. 2001)。

對於降低花粉基因流佈的措施另可設置緩衝區 (buffer zones) 或綠籬 (green fence) 隔離，所謂設置緩衝區即在基因轉殖作物田間周圍種植同種未轉殖的植株作爲緩衝區加強屏障。這種方法也可以防止一部分花粉離開作物的種植地點。而綠籬隔離即在基因轉殖作物周圍種植灌木或小喬木成叢聚形成綠色屏障，以防止花粉的遠距離擴散，除降低風速減少花粉的傳播距離外，亦可以直接阻擋一部分花粉 (Mascia & Flavell 2004; Tseng *et al*. 2012)。Scheffler *et al*. (1993) 利用同種非基因轉殖油菜作爲緩衝區，並有蜜蜂作媒介的情況下，基因轉殖油菜的傳粉率在 70 m 處降爲 0%。Hokanson *et al*. (1994) 發現基因轉殖黃瓜在無緩衝作物帶時，1 m 轉基因黃瓜在隔離距離 50 m 處的傳粉率爲 2.73%，在其周圍種植 10 m 和 20 m 的緩衝區後，其傳粉率分別降爲 0.075% 和 0%，說明緩衝區的作用十分明顯。OECD (The Organisation for Economic Co-operation and Development) 在生物技術的生物安全專家會議 (Group of National Experts on Safety in Biotechnology) 中，認爲大豆是高度自交作物，只採取物理隔離措施即可控制花粉流佈，緩衝區可有效地阻擋花粉的傳播，大大縮短傳粉距離 (OECD 1993)。另外研究顯示基因轉殖棉花直接相鄰處的傳粉率最高爲 1.8%，平均爲 0.75%，在緩衝區爲 1、10 和 20 m 時，其傳粉率依次爲 0.4、0.06 和 0.0001%。對甜菜而言，在 30 m 處的緩衝區中，檢測不到甜菜的花粉。利用 12 m 寬的緩衝作物區可使油菜的傳粉率降至 0.7% (OECD 1993)。顯示利用緩衝區設置可有效地阻擋花粉的傳播，降低花粉飛散距離。

水稻在台灣栽培面積達 22 萬公頃，是種植面積最廣的糧食作物。台灣稻米產業屬小農制，平均每戶可耕作面積低於 1 ha。利用距離隔離方式防止基因流佈，若隔離距離過長將大幅減少耕種面積，降低農民的經濟效益。反之，隔離距離過短則可能增加基因流佈風險，使基因轉殖水稻與鄰近非基因轉殖水稻混雜之可能性增高。如何在隔離距離、基因轉殖水稻種植規模大小及基因流佈等面向取得平衡，因此尋求解決基因流佈方法將是未來產業發展重要的依據。本試驗目的將探討緩衝區設置對基因轉殖水稻花粉媒介基因流佈的可能性及其頻率的影響程度，藉以瞭解緩衝區設置的效果。

材料及方法

試驗地點

本試驗實施地點爲農業委員會農業試驗所之基因轉殖植物田間試驗隔離園區 (TARI, 24°01’N, 120°41’E)。所有田間管理試驗依據農業試驗所 ‘基因轉殖植物田間試驗作業管理規範’ 之規定執行。

試驗材料

本試驗利用 2 個水稻品種，水稻 ‘台農糯 73 號’ (*O. sativa* L. ssp. *japonica* cv. ‘Tainung waxy73’; ‘TNGW73’) 爲糯稻作爲花粉接受親。轉殖植酸酵素水稻 (*O. sativa* L. ssp. *japonica*; AAN) 爲稉稻作爲花粉貢獻親。AAN 轉殖品系之外源基因是 *Selenomonas ruminantium* 植酸酵素基因 (*SrPf6*)，其主要作用是使發芽水稻種子含有大量植酸酵素，這些發芽種

子經過加工後添加到豬或家禽的飼料中，將可使所飼養動物同時獲得種子中的各種養分、礦物元素及磷 (Hong *et al*. 2004)。

花粉媒介基因流佈田間設計

本試驗利用 AAN 轉殖品系爲花粉貢獻親，'TNGW73' 爲花粉接受親，利用稉糯雜交特性來檢測雜交種子的糙米外觀，可以很容易評估花粉媒介基因流佈頻率。本試驗有二個田間設計，第一個設計爲無緩衝區田間設計 (圖 1A)，每一田區大小爲 25 m × 25 m。在田區中央種植 5 m × 5 m 面積的 AAN 轉殖品系，分別在東、東北、東南、西、西北、西南、南、北等 8 個不同方向，從距離 AAN 轉殖品系邊緣 1、3、5、7 及 9 m 處種植 'TNGW73'，其他空白區域不種植任何植物。第二個設計爲有緩衝區田間設計 (圖 1B)，與無緩衝區田間設計的田區大小、配置一樣，差別在於灰色區域種植全部種植 'TNGW73'。根據 AAN 轉殖品系和 'TNGW73' 歷年播種至開花期天數的觀察記載，調整播種期使其開花期一致，AAN 轉殖品系及 'TNGW73' 分別於 2007 年 8 月 6 日及 8 月 15 日播種，所有材料於 4–5 葉齡時移植於田間。無緩衝區與有緩衝區田區設計有二重複，多本植，田間管理依一般慣行法進行。每公頃 N、P_2O_5、K_2O 施用量分別爲 120、72 及 48 kg，硫酸銨爲氮肥 (N) 的來源，過磷酸鈣及氯化鉀分別爲磷肥 (P_2O_5) 及鉀肥 (K_2O) 的來源。在種子成熟期，於每一方向每一距離分別收穫 30 株 'TNGW73' 種子混合經風選後隨機選取 6,000 粒種子分成 3 袋種子，每袋含 2,000 粒進行檢定，每一檢測樣本總計共有 12,000 粒種子進行花粉媒介基因流佈頻率的評估。

花粉流佈頻率評估

利用稉糯雜交特性來檢測雜交種子，如果糯稻 'TNGW73' 接受了稉稻 AAN 轉殖品系的花粉，其糙米外觀呈透明狀；反之，若 'TNGW73' 自花授粉，則糙米外觀呈不透明

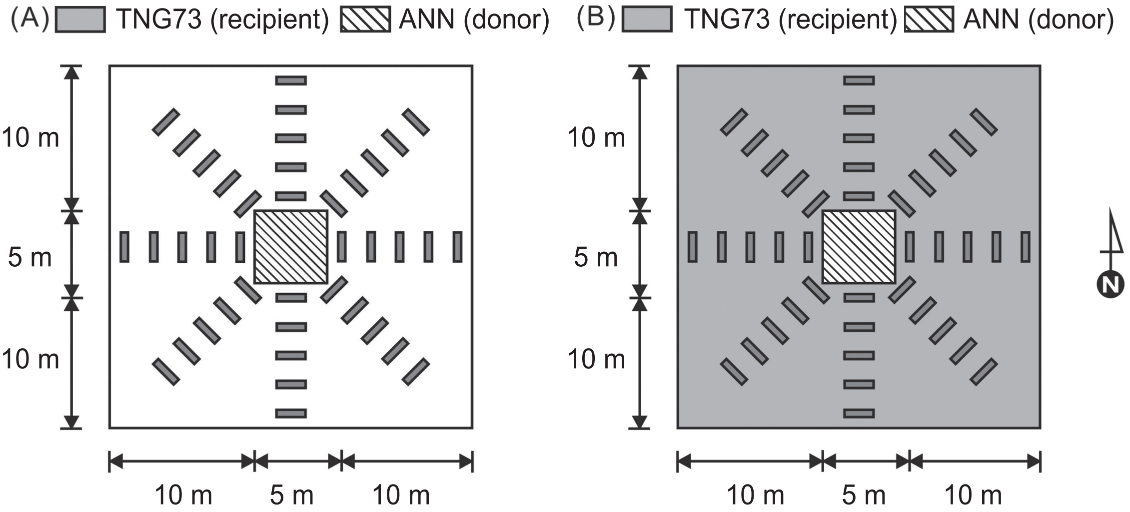

圖 1. 有、無緩衝區設置田間示意圖。(A) 無緩衝區田間設計，田區大小爲 25 m × 25 m，中央種植 5 m × 5 m 面積的 AAN 轉殖品系爲花粉貢獻親，分別在 8 個不同方向、5 個不同距離種植 'TNGW73' 當花粉接受親，其他空白區域不種植任何植物；(B) 有緩衝區田間設計，田間配置與無緩衝區一樣，差別在於灰色區域種植全部種植 'TNGW73'。

Fig. 1. Diagrams of the field experimental designs without (A) or with (B) buffer zones. Pollen donor 'TNG67' was transplanted in the central block of 5 m × 5 m, and pollen recipient 'TNGW73' was transplanted to the plots in 8 directions at 5 different distances in the open field of 25 m × 25 m. Beyond the plots, no plant and weed grew where is indicated by white space (A); beyond the plots, 'TNGW73' grew where is indicated by gray space (B).

狀。‘TNGW73’ 水稻上收穫的種子，以 45℃恒溫將種子烘乾至水分含量為 14%，再以脫殼機 (THU35B, Satake Corp., Japan) 脫殼成糙米，用肉眼觀察糙米透明度。為避免人為影響外觀檢測，呈現透明之糙米再進行碘液 (iodine solution) 反應檢定。將 0.2 g 碘與 2 g 碘化鉀 (KI) 溶解於蒸餾水中並稀釋至 100 mL，且予充分混合置於深棕色瓶中為原液，檢驗時將碘試劑原液稀釋十倍，即為試劑。用刀片將糙米橫切為兩半後置於培養皿中，加入適量的試劑，稍加搖動，靜置 3 min 後，觀察顏色變化。若為 ‘TNGW73’ 自交種子其胚乳呈褐色，若為 ‘TNGW73’ 和 AAN 雜交種子，其胚乳則呈紫黑色。花粉媒介基因流佈頻率 = 檢測到 ‘TNGW73’ 和 AAN 轉殖品系之雜交種子數目/檢測種子數目 × 100%。

氣象資料

利用農業試驗所氣象站儀器於水稻開花期間，每天於 8：00、9：00、10：00 及 11：00 測量風速與風向。

結果

水稻花粉媒介基因流佈結果

本試驗藉由調整花粉貢獻親與接受親之播種期，確保其開花期重疊，由田間觀察結果顯示 AAN 轉殖品系水稻開花期為 10 月 20–28 日；‘TNGW73’ 為 10 月 19–26 日。每一花粉貢獻親與接受親間至少有 7 d 的花期重疊，有最大的機會發生雜交。

本試驗每一檢測樣本共有 12,000 粒種子進行花粉媒介基因流佈評估檢測，所有參試材料的種子平均發芽率介於 95–98% 之間。結果顯示花粉流佈頻率受到接受親種植距離和方向所影響，花粉流佈頻率隨著種植距離增加而下降。在有緩衝區田間設計中，相距 1 m 時其花粉流佈頻率介於 1.54–3.33% 之間，平均為 2.39%，其中以南方和西南方檢測到的花粉頻率最高分別為 3.33% 和 3.10%。隨著種植距離增加在 3 m 及 5 m 處檢測到的花粉流佈頻率平均分別為 1.81% 及 1.67%。在 9 m 處檢測的花粉流佈頻率介於 0–0.84% 之間，平均為 0.38%，其中在北方及東北方僅檢測少量雜交種子，其花粉流佈頻率分別為 0.03% 和 0.01%，而東方和西方則未檢測到任何雜交種子 (表 1)。在無緩衝區田間設計中，也得到類似結果。相距 1 m 時其花粉流佈頻率介於 1.24–3.64% 之間，平均為 2.28%，其中以西南方和東南方檢測到的花粉頻率最高分別為 3.64% 和 3.02%。隨著種植距離增加在 3 m 及 5 m 處檢測到的花粉流佈頻率平均分別為 1.84% 及 1.53%。在 9 m 處所有方向仍皆檢測到雜交種子，其花粉流佈頻率介於 0.52–1.65% 之間，平均為 1.04%，其中仍然以西南方 (1.55%) 和東南方 (1.65%) 檢測到的花粉頻率最高 (表 2)。

表 1. 基因轉殖植酸酵素水稻 (AAN) 於農業試驗所隔離試驗田區在有緩衝區 8 個方向、5 個不同距離之花粉流佈平均頻度 (%) 的結果。

Table 1. Frequency of outcrossed seeds of pollen recipient ‘TNGW73’ in 8 directions and 5 distances from the pollen donor AAN with buffer zones at the confined field sites in Taiwan Agriculture Research Institute.

Distance[z] (m)	Frequency of outcrossed seeds (%)								
	North	Northeast	East	Southeast	South	Southwest	West	Northwest	Average
1	1.88 ± 0.20[y]	1.76 ± 0.35	2.15 ± 0.57	2.70 ± 0.32	3.33 ± 0.25	3.10 ± 0.56	2.63 ± 0.13	1.54 ± 0.36	2.39
3	1.85 ± 0.35	1.20 ± 0.16	1.85 ± 0.39	2.15 ± 0.24	2.72 ± 0.38	2.03 ± 0.36	1.45 ± 0.14	1.23 ± 0.45	1.81
5	1.58 ± 0.09	1.25 ± 0.56	1.36 ± 0.21	2.70 ± 0.67	2.42 ± 0.54	1.47 ± 0.25	0.97 ± 0.07	1.60 ± 0.25	1.67
7	0.23 ± 0.13	0.43 ± 0.13	0.52 ± 0.09	1.73 ± 0.37	1.80 ± 0.13	1.60 ± 0.22	0.55 ± 0.04	1.50 ± 0.17	1.05
9	0.03 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0	0.84 ± 0.61	0.83 ± 0.21	0.63 ± 0.03	0	0.60 ± 0.08	0.38
Average	1.11	0.95	1.18	2.02	2.22	1.77	1.12	1.29	1.46

[z] Distance between recipient plots (‘TNGW73’) and the donor plot (AAN).

[y] Mean ± SE (n = 3).

表 2. 基因轉殖植酸酵素水稻 (AAN) 於農業試驗所隔離試驗田區在無緩衝區於 8 個方向、5 個不同距離之花粉流佈平均頻度 (%) 的結果。

Table 2. Frequency of outcrossed seeds of pollen recipient 'TNGW73' in 8 directions and 5 distances from the pollen donor AAN without buffer zones at the confined field sites in Taiwan Agriculture Research Institute.

Distance[z] (m)	Frequency of outcrossed seeds (%)								
	North	Northeast	East	Southeast	South	Southwest	West	Northwest	Average
1	1.82 ± 0.32[y]	1.35 ± 0.11	2.38 ± 0.45	3.02 ± 0.57	2.58 ± 0.32	3.64 ± 0.25	2.23 ± 0.35	1.24 ± 0.16	2.28
3	1.18 ± 0.18	0.85 ± 0.26	2.34 ± 0.56	2.67 ± 0.31	2.88 ± 0.42	2.15 ± 0.11	1.82 ± 0.05	0.84 ± 0.21	1.84
5	0.85 ± 0.12	1.21 ± 0.14	1.58 ± 0.25	2.57 ± 0.35	1.87 ± 0.32	2.52 ± 0.21	1.20 ± 0.21	0.45 ± 0.12	1.53
7	1.20 ± 0.35	1.45 ± 0.28	1.30 ± 0.16	2.14 ± 0.27	1.98 ± 0.41	1.97 ± 0.24	1.01 ± 0.13	0.55 ± 0.21	1.51
9	0.52 ± 0.13	0.62 ± 0.13	0.80 ± 0.08	1.65 ± 0.13	1.53 ± 0.65	1.55 ± 0.03	0.63 ± 0.03	0.98 ± 0.30	1.04
Average	1.11	1.10	1.68	2.41	2.17	2.36	1.38	0.81	1.64

[z] Distance between recipient plots ('TNGW73') and the donor plot (AAN).

[y] Mean ± SE (n = 3).

表 3. '台農糯 73 號' 水稻在農業試驗所隔離試驗田區 10 d 開花期間的風向與風速氣象資料。

Table 3. Wind direction and velocity during the 10 days of 'TNGW73' flowering at the confinement field sites of Taiwan Agriculture Research Institute.

Wind direction from	Hours	Wind speed (m s^{-1})
North	9	0.6–4.7
Northeast	2	0.7–2.0
East	0	0
Southeast	0	0
South	2	0.7–4.2
Southwest	2	0–2.5
West	3	0.6–4.2
Northwest	22	1.4–9.8

氣象資料結果

花粉媒介的基因流佈在自然條件下，容易受到風向與風速等氣象因子影響，存在著較大的方向性。表 3 爲水稻開花期間所收集的氣象資料，資料顯示在開花期間 10 d 40 個小時的記錄點中，有 22 個小時是西北方風向，其風速介於 1.4–9.8 m s^{-1} 之間，9 個小時是北方風向，其風速介於 0.6–4.7 m s^{-1} 之間，而在 40 個小時記錄點中未測得東方和東南方的風向及風速資料。對照水稻開花期間的氣象資料，發現開花時風向及風速明顯影響基因流佈發生頻率的高低。從氣象資料顯示有 78% (31/40) 的時間爲北方及西北方向，且其最大風速達 9.8 ms^{-1}，在有緩衝區田間設計中，位於下風處南方、東南方及西南方處皆測得較高的雜交種子，花粉流佈頻率平均分別爲 2.22、2.02 和 1.77%。然而相對地在上風處北方及東北方向測得較少雜交種子，其花粉流佈頻率平均爲 1.11% 和 0.95% (表 1、圖 2)。同樣地在無緩衝區田間設計中位於下風處南方、東南方及西南方向測得較高的雜交種子，花粉流佈頻率平均分別爲 2.17、2.41 和 2.36%。相對地在上風處東北方及西北方向測得較少雜交種子，其花粉流佈頻率平均爲 1.10% 和 0.81% (表 2、圖 2)，結果顯示花粉流佈頻率存在著極大的方向性。

討論

緩衝區設置效果

基因轉殖作物商業化生產最受關注的議題

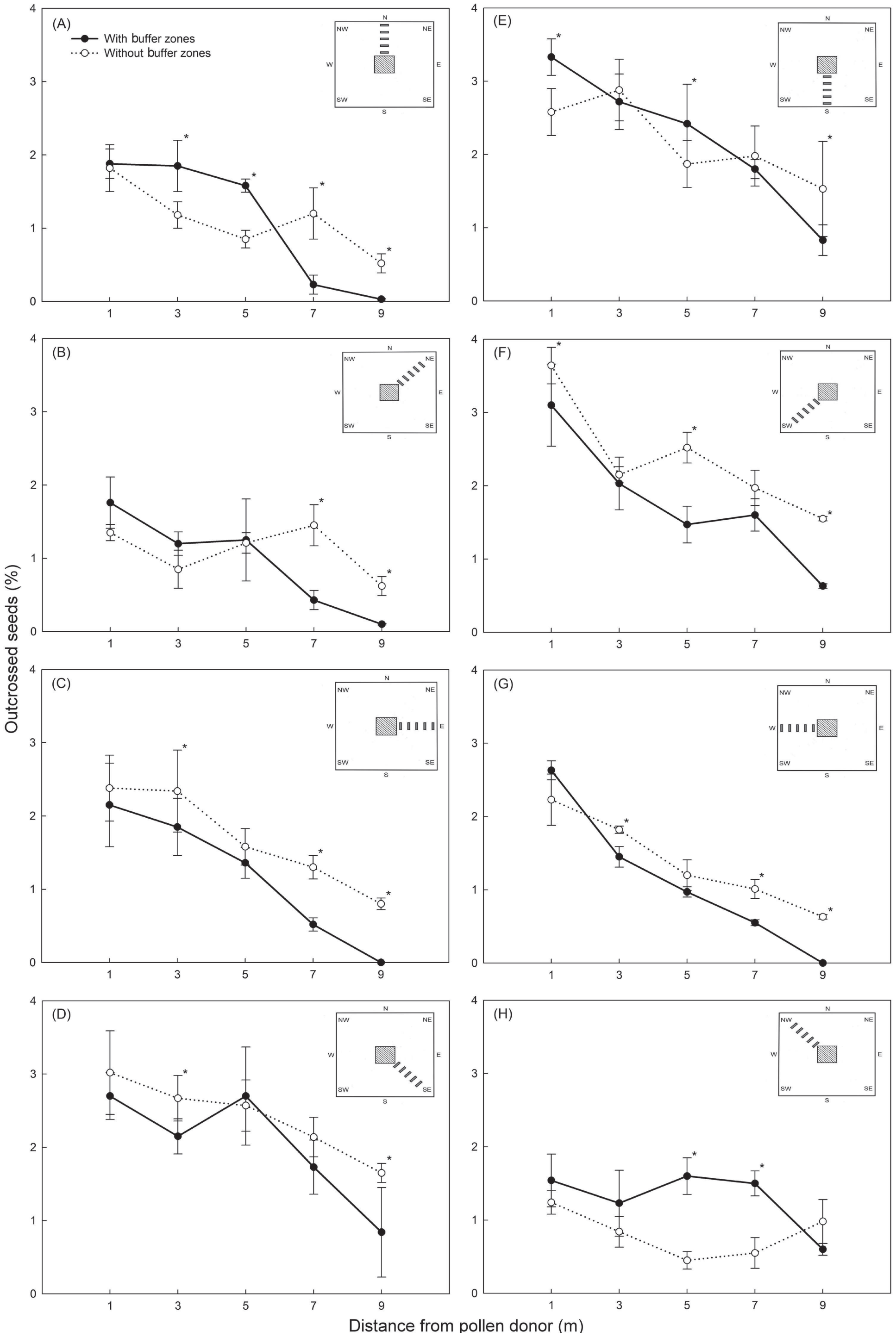

圖 2. 基因轉殖植酸酵素水稻 (AAN) 有緩衝區和無緩衝區設置在 8 個不同方向之花粉流佈平均頻度 (%) 的結果。

Fig. 2. Frequency of outcrossed seeds of pollen recipient 'TNGW73' in 8 directions from the pollen donor AAN in the open field with buffer zones and without buffer zones. Error bars represent standard error of two replications. * indicates significantly difference at level of $P < 0.05$ according to t-test.

是外源基因透過花粉媒介進而污染鄰近田區的非基因轉殖作物，防範基因轉殖水稻種植造成商業品種稻米生產之混雜風險，最好的方法是杜絕花粉媒介的基因流佈。本研究利用有緩衝區與無緩衝區設置防範水稻花粉流佈，結果在 1、3 及 5 m 距離之花粉流佈頻率二者間並無顯著差異，但在 7 m (1.05%, 1.51%) 及 9 m (0.38%, 1.04%) 處二者間有顯著差異 (表 1、2)。顯示利用 5 m 的緩衝區，對於水稻花粉的擴散並無法達到有效的阻隔，然而利用 7 m 緩衝區則有明顯的防範作用，可以使花粉流佈頻率降至 1.05%，9 m 則可以降至 0.38%。Damgaard & Kjellsson (2005) 利用隔離距離及緩衝區來探討基因轉殖油菜的花粉流佈，建議最佳的商業化栽種管理策略是採用 100 m 的隔離距離，可以將基因轉殖油菜花粉流佈頻率控制在 0.1% 以下。其次是用 50 m 的隔離距離，花粉流佈頻率可以降至 0.3% 以下。最後才是利用 5 m 的緩衝區，可以降低基因轉殖油菜的花粉流佈頻率至 0.53%。OECD 則建議利用 12 m 寬的緩衝作物區可使油菜的傳粉率降至 0.7% (OECD 1993)。

氣象因子與緩衝區設置之關聯性

水稻為風媒花，開花時的氣候因子特別是風向及風速容易影響水稻花粉的散佈。由田間的氣象資料顯示，在開花的 10 d 中，風向主要是從北方、西北方往南方和東南方，其最大風速達 9.8 m s^{-1}，致使在有緩衝區設置位於下風南方與東南方 7 m 處檢測到的花粉流佈頻率分別為 1.80% 和 1.73%，與無緩衝設置差異不大，其花粉流佈頻率分別為 1.98% 和 2.14%。然而在 9 m 處其花粉流佈頻率有顯著的差別，有緩衝區設置南方與東南方 9 m 處的花粉流佈頻率分別為 0.83% 和 0.84%，而無緩衝設置則分別為 1.53% 和 1.65%。顯示在風速比較大的情況下，7 m 的緩衝區設置並不會影響風向對於花粉流佈頻率造成的結果，但超過 9 m 則有明顯差異。

同樣地由田間的氣象資料結果顯示，在開花期間並無東方及東南方風向，僅有 2 個時間點是西南方風向，其風速介於 0–2.5 m s^{-1}，致使位於上風處西方 1 m 處，有緩衝區設置的花粉流佈頻率為 2.63% 高於無緩衝區設置的 2.23%，然而 3 m 後，隨著距離增加有緩衝區設置的花粉流佈頻率明顯低於無緩衝區設置。同樣地在北方與東北方也有類似的結果，有緩衝區設置在 1、3 及 5 m 處的花粉流佈頻率高於無緩衝區設置，但在 7 m 以後有緩衝區設置的花粉流佈頻率則明顯低於無緩衝區設置，顯示在無風向或風速比較小的情況下，有緩衝區的設置仍會影響風向對於花粉流佈頻率造成的結果。

利用緩衝區設置雖可以有效地阻擋花粉的傳播，降低花粉飛散距離，但並無法完全的阻隔，在 9 m 處仍偵測到雜交種子，其花粉流佈頻率平均為 0.38%。根據北海道基因轉殖作物種植所致的雜交防止條例規範水稻的隔離距離為 300 m，然而研究結果顯示在距離 300 m 及 450 m 處調查水稻雜交頻率分別為 0.023% 和 0.006%，在 600 m 仍舊有發現雜交種子 (Bio Journal 2008, http://www5d.biglobe.ne.jp/~cbic/english/2008/journal0805.html)。Devos *et al*. (2005) 認為在基因轉殖作物田間周圍種植同種未轉殖的植株作為緩衝區雖可防止一部分花粉離開種植地點，但無法造成完全的隔離。

台灣地狹人稠，現有耕地主要栽種水稻，若利用隔離距離，距離過長將大幅減少耕種面積，降低農民的經濟效益，反之，隔離距離過短則可能增加基因流佈風險，使基因轉殖作物與鄰近非基因轉殖作物混雜之可能性增高。研究顯示利用緩衝區的設置並無法有效地的防止水稻花粉流佈，在基因轉殖作物周圍種植高大的植物當綠籬形成屏障防止花粉的遠距離擴散，可以使基因轉殖作物藉由花粉媒介的基因流佈風險降至最低 (Arritt *et al*. 2007; Prescher *et al*. 2010; Tseng *et al*. 2012)。

引用文獻

Arritt, R. W., J. Astini, C. A. Clark, J. M. E. Westgabe, and A. S. Goggi. 2007. Biological windbreaks for pollen confinement. p.131–134. *in*: Proceedings of the 3rd International Conference on Coexistence between Genetically Modified (GM) and Non-GM Based Agricultural Supply Chains. November

20–21, 2007. Seville, Spain. IPTS, JRC. Seville.

Chandler, S. and J. M. Dunwell. 2008. Gene flow, risk assessment and the environmental release of transgenic plants. Crit. Rev. Plant Sci. 27:25–49.

Chen, L. J., D. S. Lee, Z. P. Song, H. S. Suh, and B. R. Lu. 2004. Gene flow from cultivated rice (*Oryza sativa*) to its weedy and wild relatives. Ann. Bot. 93:67–73.

James, C. 2012. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012. ISAAA Briefs 44, ISAAA. Ithaca, NY. 243pp.

Damgaard, C. and G. Kjellsson. 2005. Gene flow of oilseed rape (*Brassica napus*) according to isolation distance and buffer zone. Agric. Ecosyst. Environ. 108:291–301.

Devos, Y., D. Reheul, and A. De Schrijver A. 2005. The co-existence between transgenic and non-transgenic maize in the European Union: a focus on pollen flow and cross-fertilization. Environ. Biosafety Res. 4:71–87.

Hokanson, S. C., J. F. Hancock, and R. Grumet. 1994. Can border rows serve to limit the long distance movement of transgenic pollen? p.418. *in*: Proceedings of the 3rd International Symposium on the Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and microorganisms. November 13–16, 1994. Oakland, California. The Univ. of California.

Hong, C. Y., K. J. Chen, L. F. Liu, T. H. Tseng, C. S. Wang, and S. M. Yu. 2004. Production of two highly active bacterial phytases with broad pH optima in germinated transgenic rice seeds. Transgenic Res. 13:29–39.

Lu, B. A., Z. P. Song, and J. K. Chen. 2003. Can transgenic rice cause ecological risks through transgene escape? Prog. Nat. Sci. 13:17–24.

Mascia, P. N. and R. B. Flavell. 2004. Safe and acceptable strategies for producing foreign molecules in plants. Curr. Opin. Plant Biol. 7:189–195.

Messeguer, J., V. Marfà, M. M. Català, E. Guiderdoni, and E. Melé. 2004. A field study of pollen-mediated gene flow from Mediterranean GM rice to conventional rice and the red rice weed. Mol. Breed. 13:103–112.

OECD. 1993. Group of National Experts on Safety in Biotechnology. The Organisation for Ecinomic Cooperation and Development Press. Paris. 7 pp.

Prescher, S., J. Schiemann, and A. Hüsken. 2010. Study of maize fields and their surroundings in European regions regarding the suitability for coexistence of different maize cultivars. p.84–88. *in*: Implications of GM-Crop Cultivation at Large Spatial Scales. (Breckling, B. and R. Verhoeven, eds.) Peter Lang GmbH Pub. Frankfurt, German. 180 pp.

Remund, K. M., D. A. Dixon, D. L. Wright, and L. R. Holden. 2001. Statistical considerations in seed purity testing for transgenic traits. Seed Sci. Res. 11:101–119.

Scheffler, J., R. Parkinson, and P. J. Dale. 1993. Frequency and distance of pollon dispersal from transgenic oil seed rap (*Brassican apus*). Transgenic Res. 2:235–236.

Song, Z. P., B. R. Lu, Y. G. Zhu, and J. K. Chen. 2002. Pollen competition between cultivated and wild rice species (*Oryza sativa* and *O. rufipogon*). New Phytol. 153:289–296.

Song, Z. P., B. R. Lu, and J. K. Chen. 2004. Pollen flow of cultivated rice measured under experimental conditions. Biodivers. Conserv. 13:579–590.

Tseng, C. S., M. T. Wu, H. C. Huang, and Y. R. Lin. 2012. The green fence of Chinese hibiscus (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) prevents pollen dispersal of transgenic Rice (*Oryza sativa*). Plant Prod. Sci. 15:100–108.

Wang, F., Q. H. Yuan, L. Shi, Q. Qian, W. G. Liu, B. G. Kuang, D. L. Zeng, Y. L. Liao, B. Cao, and S. R. Jia. 2006. A large-scale field study of transgene flow from cultivated rice (*Oryza sativa*) to common wild rice (*O. rufipogon*) and barnyardgrass (*Echinochloa crusgalli*). Plant Biotechnol. J. 4:667–676.

Effect of Buffer Zones on Pollen-Mediated Gene Flow of Transgenic Rice

Ching-Shan Tseng[1], Yann-Rong Lin[2], Cheng-Ping Kuan[1], Ming-Hsing Lai[3], and Min-Tze Wu[4,*]

Abstract

Tseng, C. S., Y. R. Lin, C. P. Kuan, M. H. Lai, and M. T. Wu. 2013. Effect of buffer zones on pollen-mediated gene flow of transgenic rice. J. Taiwan Agric. Res. 62(3):259–267.

In this study, the non-glutinous of phytase-transformed rice line AAN (*Oryza sativa* L. ssp *japonica*) was used as the pollen donor and the glutinous rice 'Tainung waxy 73' (*O. sativa* L. ssp. *japonica* cv. 'TNGW73') was used as the pollen recipient. The objective of this research was to study the effect of buffer zones on pollen dispersal of transgenic rice in the open fields. Results showed that the frequency of outcrossed seeds varied with the distances and directions. The frequencies of outcrossed seeds were not significantly different in the south and southeast directions within 7 m between buffer zones and non-buffer zones treatments. However, there were significantly different frequencies of outcrossed seeds at 9-m distance between buffer zones and non-buffer zones treatments. The frequency of outcrossed seeds with buffer zone was 0.83% (south) and 0.84% (southeast) and 1.53% (south) and 1.65% (southeast) for non-buffer zones, respectively. The frequency of outcrossed seeds of plots with buffer zones was higher than those without buffer zones in the north and northeast at distance of 1, 3, and 5 m. However, the frequency of outcrossed seeds of plots with buffer zones was significantly lower than those without buffer zone beyond 7 m. This study indicated buffer zones longer than 7 m could decrease the frequency of outcrossed seeds by pollen-mediated gene flow in the directions against wind.

Key words: Transgenic rice, Pollen-mediated gen flow, Buffer zones.

Received: June 3, 2013; Accepted: July 31, 2013.
* Corresponding author, e-mail: wu@tari.gov.tw
1 Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
2 Associate Professor, Department of Agronomy, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.
3 Associate Research Fellow, Crop Science Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
4 Research Fellow and Director, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 62(3):268–279 (2013)
DOI: 10.6156/JTAR/2013.06203.07

百合 *Plantago asiatica mosaic virus* 檢測試劑製備與提升病毒檢出率之血清檢定法研發

陳金枝 [1,*] 張郁靈 [2] 林碧雲 [2] 江芬蘭 [2] 鄭櫻慧 [3] 鄧汀欽 [4]

摘要

陳金枝、張郁靈、林碧雲、江芬蘭、鄭櫻慧、鄧汀欽。2013。百合 *Plantago asiatica mosaic virus* 檢測試劑製備與提升病毒檢出率之血清檢定法研發。台灣農業研究 62(3):268–279。

2011 年初於國外進口之百合種球首次以核酸檢測法檢出一種屬於 *Potexvirus* 之病毒核酸片段，由核酸序列鑑定確認其為國外已報告之車前草嵌紋病毒 (*Plantago asiatica mosaic virus*; PlAMV)。進一步依據 GenBank 上已登錄之 PlAMV 核酸序列，設計可增幅全長度鞘蛋白基因序列之引子對 PlAMV-cpup (5'-CCGCGGCCGCCACACTACTC) 及 PlAMV-cpdw (5'-GGCCCACCAGACTTTCACT)，針對進口百合種球之罹病組織 (代號 LV1) 之全量核酸進行 RT-PCR 檢測，可增幅出預估 933 bp 之核酸片段產物，此核酸片段進一步選殖與定序結果，證實其帶有 PlAMV 之全長度鞘蛋白基因，且與 GenBank 上已登錄之 PlAMV 病毒 (accession no. AB360794.1) 之鞘蛋白胺基酸序列相同度高達 93% 以上。利用細菌表現蛋白系統所生成之 PlAMV-LV1 鞘蛋白作為抗原進行抗血清製備，所製備出之 PlAMV-LV1 多元抗體可成功應用於 Indirect ELISA (Indirect enzyme-linked immunosorbent assay) 及西方轉漬法 (western blotting) 等血清檢定法而專一性地檢出此病毒，並發現以直接組織轉漬法 (direct tissue blotting; DTB) 於植株不同部位組織上對此百合病毒的檢出率均顯著高於用 ELISA 檢測的結果；植株地下部之病毒檢出率，由根系檢出者顯著地高於由種球鱗片檢出者。運用 PlAMV-cpup/PlAMV-cpdw 引子對，可應用於不同品系百合的 PlAMV CP 之 RT-PCR 檢測。由上述結果顯示，本研究所開發之 PlAMV 血清與核酸檢測試劑，可應用於百合之 PlAMV 檢定，尤其 DTB 法為一種可有效地提升百合檢出 PlAMV 的血清檢定方式。

關鍵詞：百合病毒病、車前草嵌紋病毒、血清製備、直接組織轉漬法、RT-PCR 檢測。

前言

百合爲本省具經濟重要性之球根花卉，目前所栽培之種球絕大多數均由國外進口，百合栽培過程中受病毒感染而影響切花品質。記錄上共有十餘種病毒可危害百合，目前國內已鑑定可感染百合之病毒包括百合斑紋病毒 (*Lily mottle virus*; LiMV) (Derks 1995; Zheng *et al*. 2003)、胡瓜嵌紋病毒 (*Cucumber mosaic virus*; CMV) (Derks 1995)、百合隱徵型病毒 (*Lily symptomless virus*; LSV)、百合 X 病毒 (*Lily virus* X; LVX) (Memelink *et al*. 1990) 及草莓潛隱輪斑病毒 (*Strawberry latent ringspot virus*; SLRSV) (Cohen *et al*. 1995; Chang *et al*. 2001) 等。

車前草嵌紋病毒 (*Plantago asiatica mosaic virus*; PlAMV)，爲 *Potexvirus* 屬病毒成員，病毒顆粒呈絲狀，長度約 490–530 nm，

投稿日期：2013 年 5 月 17 日；接受日期：2013 年 8 月 7 日。
[*] 通訊作者：chinzue@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所植物病理組助理研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所植物病理組研究助理。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所植物病理組副研究員。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所植物病理組研究員。台灣 台中市。

鞘蛋白分子量約爲 22 kDa (Solovyev *et al*. 1994; Komatsu *et al*. 2008)。PlAMV 首次於 1976 年在前蘇聯之車前草 (*Plantago asiatica*) 上發現，主要藉由機械性傷口及種苗帶毒而傳播 (Komatsu *et al*. 2008)。PlAMV 主要分布在中亞地區，近年來於世界各地陸續有不同寄主被報導有此病毒的發生，包括蘇聯、日本、美國及荷蘭等。PlAMV 寄主範圍廣，包括美國之小蘗科南天竹 (*Nandina domestica*) (Hughes *et al*. 2005)；日本之歐洲櫻草 (Yamashita *et al*. 2003)、百合屬之胭脂花及天女報春花 (*Primula sieboldii*) (Komatsu *et al*. 2008)。人工接種之寄主包括奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.)、紅藜 (*Chenopodium amaranticolor*)、煙草 (*Nicotiana benthamiana* & *Nicotiana occidentailis*)、千日紅 (*Gomphrea globosa*)、菠菜 (*Spinacea oleracea*)、番杏 (*Tetragonia expansa*) 等 (Hughes *et al*. 2005; Ozeki *et al*. 2006)，其他寄主則尚未定論。

2003 年間，由日本學者首次證實 PlAMV 可感染百合 (Takeuchi & Sasaki 2003)；荷蘭於 2010 年由其植物保護署 (Protection Service of the Netherlands) 報導指出此病毒引起溫室所種植之百合植株之葉片會出現黃化壞疽型病徵，造成花卉產值下降 (引用自網路資料 http://www.vwa.nl/txmpub/files/?p_file_id=2001424)。根據國外的報告顯示，百合植株被 PlAMV 感染後，造成百合植株葉片呈現壞疽型病徵 (Takeuchi & Sasaki 2003)，嚴重影響植株之生育與開花品質；而在百合上，目前已知此病毒主要經由種球帶毒長途傳播，此途徑使得此病毒容易隨進口種球而有引進國內之風險；若種植帶毒種球後，透過汁液機械傳播方式，於切花採收過程的切離傷口使得剪枝工具上沾有病毒汁液，則病毒會隨連續切花程序而有將病毒傳播於健康植株上的風險。因此防治此病毒之根本策略，乃於百合進口種球上強化對此病毒之檢疫措施，以防堵病毒隨種球而輸入國內，準確而有效率之病毒檢定技術更可早期檢出帶毒種球以因應。

本研究以進口百合種球所檢測到的 PlAMV 病組織爲材料，在溫室隔離栽培環境的觀察下進行試驗。利用病組織之全量核酸爲模板，以 RT-PCR 法取得 PlAMV 之病毒鞘蛋白基因進行病毒的分子鑑定，並開發 PlAMV 之核酸檢測技術；利用分子選殖病毒鞘蛋白分子並於細菌生合成系統內進行鞘蛋白的表現，進一步純化表現蛋白作爲抗原，以製備對應 PlAMV 病毒之多元抗體；建立能準確檢出病毒的取樣部位與血清檢測方式，提昇對 PlAMV 的檢出效率與檢定準確性，強化對此病毒之檢防疫監測能力。

材料及方法

病毒材料來源及 *Potexvirus* 核酸片段增幅選殖與定序鑑定

本研究於 2011 年由國外進口百合種球 (Gracia 品系) 檢測出疑似病毒感染者，代號 LV1，取其罹病組織 0.1 g，以液態氮研磨均勻，利用植物全量核酸純化試劑組 RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) 進行 RNA 純化。取 LV1 病組織之總量核酸並參考 Miglino *et al*. (2006) 所發表的 *Potexvirus* 屬鑑別用引子對 (Potex 4/Potex 5) 以進行 RT-PCR 反應，反應條件依照試劑組 (GeneMark Co., Taichung, Taiwan) 提供的步驟方法進行：每 50 μL 反應液中分別加入 2 μL 之全量核酸 (RNA)、10 μL 之 5× Reaction Mix、10 μL 之 Enhancer、1 μL 之 RNase Block、1 μL 之 Enzyme Mix、各 2.5 μL 之 Potex 4/Potex 5 引子對及 21 μL 之 Nuclease-free water。於熱循環反應器中 (GeneAmp model 2400, Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT)，設定反應程序爲 50℃下進行反轉錄 30 min，94℃變性 2 min；之後進行 30 個 PCR 循環：94℃變性 1 min 30 s，52℃鍊合 50 s，72℃聚合 2 min，最後一個循環之 72℃聚合反應延長 6 min。

反應結果以 1.2% 電泳瓊膠 (Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, ME, USA) 進行分析。將預估大小約 280 bp 的核酸片段增幅條帶，利用 Micro-Elute DNA Clean Extraction 試劑組 (GeneMark Co., Taichung, Taiwan) 及其建議方法進行純化，並將純化所

得之核酸片段進行定序分析。

PlAMV 核酸分子片段選殖與定序分析鑑定

利用 *Potexvirus* 屬鑑別用引子對 Potex 4/ Potex 5 引子對進行 RT-PCR 反應所增幅出之 LV1 罹病百合組織之核酸片段 (280 bp) (結果未顯示)，經定序分析結果顯示其係屬 *Potexvirus* 之 *Plantago asiatica mosaic virus* 核酸部分片段。為進一步釐清病毒分類地位，選用 GenBank 上已登錄之 7 個 PlAMV 分離株的鞘蛋白 (coat protein; CP) 序列 (登錄序號分別為 AB360795.1、AB360794.1、AB360793.1、AB360792.1、AB360791.1、AB360796.1 及 AB360790.1)，針對其全長度鞘蛋白核酸序列兩端之高保留區域設計引子對 PlAMV-cpup (5'-CCGCGGCCGCCACACTACTC) 及 PlAMV-cpdw (5'-GGCCCACCAGACTTTCACT)。將百合罹病組織 (LV1) 之全量核酸以 PlAMV-cpup/ PlAMV-cpdw 引子對進行 RT-PCR 反應，反應條件如使用 Potex 4/Potex 5 引子對反應所述。反應結果預估可增幅出 933 bp 的核酸片段。取此核酸片段構築於 pGEM-T Easy Vector Systems (Promaga, Madison, WI, USA) 載體上，進行核酸選殖與定序分析，方法如以往報告所示 (Chiang *et al.* 2011)。

PlAMV 病毒鞘蛋白分子選殖與表現

LV1 鞘蛋白 (CP) 基因定序確認後，由於 PlAMV-LV1 之 CP 基因本身於其 5' 端起始以及近 3' 端的核甘酸序列已分別含有對應 *Nco*I (CCATGG) 以及 *Xho*I (CTCGAG) 限制酵素切位，因此在表現蛋白之構築時乃直接以 *Nco*I/ *Xho*I 切取大小僅約 576 bp 之 CP 核酸片段，次選殖於表現載體 pET-28b (+) (Novagen, Inc. Madison, WI, USA) 上，並轉型於 *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3)。轉型株以 M9 培養基培養 (Li *et al*. 1998)，以 1 mg mL^{-1} 之 IPTG (isopropyl-β-D- thiogalactopyranoside) 誘導蛋白質表現 (Chen *et al*. 2002)。IPTG 誘導培養後之菌液以 8,000 rpm 轉速 (Spectrafuge 24D 型，Labnet Inc. NJ, USA) 離心 10 min，取其沉澱物以 0.5 M Tris-EDTA (pH 8.0) 之緩衝液溶解均勻，並進行 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 電泳，以分析表現蛋白之分子量。選用確定有預估大小約 21 kDa 表現蛋白之選殖株進行大量培養與純化表現蛋白，將表現蛋白純化濃縮為 1 mg mL^{-1} 以作為抗原，並送交濁水溪生物科技有限公司 (桃園，台灣) 進行兔免疫注射製備多元抗體。

PlAMV 多元抗體免疫檢測效果

酵素連結免疫吸附法 (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)：本研究採用間接酵素連結免疫吸附法 (Indirect ELISA) 進行病毒之 ELISA 檢測。取 0.1 g 之待測組織於研磨袋，加入 3 mL 之 15 mM 碳酸鈉緩衝液 (sodium carbonate buffer, pH 9.6) 研磨均勻後，將組織液加到 ELISA 反應盤內 (100 µL/孔)，放入 37℃培養箱 3–4 h (或 4℃隔夜) 進行覆膜反應，之後以 1× PBST 清洗 3 次，每次浸泡 3 min；加入自製之 PlAMV-LV1 抗體 (#184)，放置於 25℃恆溫箱反應 3–4 h；爾後以 1× PBST 清洗 3 次，每次浸泡 3 min；再加入已稀釋 6,000 倍之山羊抗兔二次抗體 (Goat anti-Rabbit immunoglobin, Jackson, West Grove, PA) (100 µL/孔)，置於 25℃恆溫箱反應 3–4 h；最後再以 1× PBST 清洗 3 次，每次浸泡 3 min；加入 1 mg mL^{-1} 之鹼性磷酸酶基質 (p-NPP, Amresco, Solon Ind., Ohio, USA) (150 µL/孔) 進行呈色反應。以 ELISA 讀值儀 (PTI max micro plate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 讀取波長為 405 nm 下之吸收值，作為評估病毒濃度高低之依據 (Clark & Adams 1977)。樣品讀值若大於健康組織讀值 2 倍者，視為正反應。

SDS-免疫擴散反應 (Sodium-dodecyl sulfate immunodiffusion test)：將待測組織研磨均勻，與二次蒸餾水、3% SDS 以等量 (g：mL：mL) 混合均勻，取 400 µL 混合組織液至 1.5 mL 的微量離心管內，於 100℃熱水中悶煮 3 min，作為 SDS 處理過之抗原，再取製備完成的 PlAMV-LV1 抗血清 (#184) 進行 SDS-免疫擴散反應 (Purcifull & Batchelor 1977)。

西方墨點法 (weatern blotting)：取 0.1 g

待測組織置於 1.5 mL 微量離心管內，加入液態氮磨碎，加入 200 µL dissociation buffer (240 mM Tris HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 2% SDS, 4% β-Mercaptoethanol) 混勻。再加入 200 µL 之 LDS 溶液 (Laemmli 1970) 混合後，於 100℃熱水中悶熱 3–5 min，以 8,000 rpm (Spectrafuge 24D 型) 離心 5 min 後取上清液進行電泳分析。取電泳完之 SDS-PAGE 膠體，轉漬於 PVDF 膜 (Millipore Co., MA, USA)，並與 PlAMV-LV1 抗血清 (#184) 進行免疫反應。

直接組織轉漬法 (Direct tissue blotting; DTB)：將檢出有 PlAMV 之進口百合種球種植於溫室隔離管理之，分別取植株之鱗片組織、根系、植株葉片、莖部等部位組織，參考 Lin *et al*. (1990) 所發表之直接組織轉漬法及以往研究方法 (Chen & Chang 1999) 進行反應，以自製之 PlAMV-LV1 多元抗體 (#184) 進行百合病毒之檢測。將各部位組織以刀片切取後，將新鮮切面印漬於 Nylon 膜 (Stratagene, La Jolla, CA) 上，將 Nylon 膜依反應步驟之順序 (Chen & Chang 1999) 依次移入稀釋 1,000 倍之 PlAMV-LV1 IgG 抗體溶液 (1 mg mL^{-1})、稀釋 6,000 倍之山羊抗兔免疫球蛋白 (Goat anti-rabbit IgG, Jackson, West Grove, PA) 中，各於室溫下反應 1 h，最終加入 BCIP/NBT 呈色液 (Alkaline phosphatase substrate kit, Bio-Rad, Hercules, CA) (Blake *et al*. 1984) 反應之。受測樣品之正反應結果係以樣品轉漬印出現與健全對照樣品者有明顯差異之藍黑色反應作為判斷之依據 (圖 1)。

ELISA 與 DTB 法對檢測百合 PlAMV 之效率比較

為了解 ELISA 與 DTB 兩種病毒檢測方法、百合品種與百合不同取樣部位，是否對病毒檢出率結果具有交互作用及顯著差異性影響，本試驗選用百合進口種球並於溫室隔離栽培下，針對檢出有 PlAMV 並顯現典型黃化壞疽病徵之植株，取植株不同部位組織包括種球鱗片、根系、莖部及葉片等，分別以 Indirect ELISA 與 DTB 法進行檢測，分析各部位之病毒檢出率 [(病毒正反應數/檢測數) × 100%]。本試驗選用 ConcaDor 及 Manissa 兩個品系各 11 株進行試驗，將前述不同部位組織所測得之病毒檢出率數據以 SAS JMP 程式 (version 10.0, SAS Institute, Cary, NC, USA) 進行因子變異數分析 (factor ANOVA) (Steel *et al*. 1997; Tukey 1953)，評估檢測方法、百合品種與檢測部位等三種因子對病毒檢出率之影響。

PlAMV-LV1 多元抗體及核酸引子對之專一性檢測

將 PlAMV-LV1 多元抗體與 PlAMV 抗原組織以及研究室所保存之不同罹病組織之 *Potexvirus* 屬病毒包括百合之 *Lily virus* X (LVX)、紅龍果之 *Cactus virus* X (CVX)、蝴

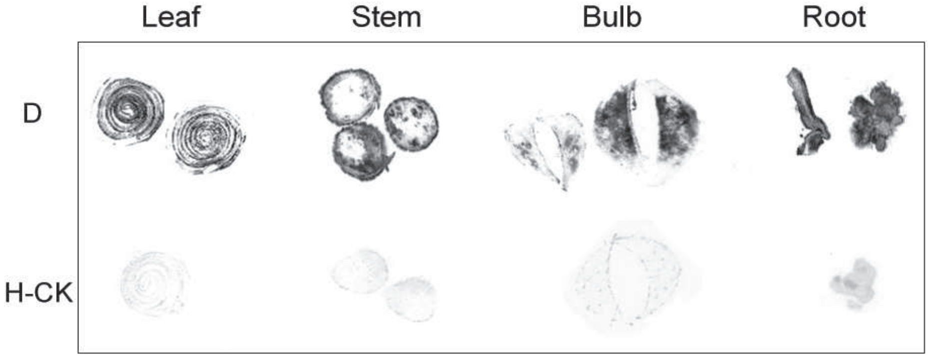

圖 1. 以直接組織轉漬法於百合不同部位檢測 *Plantago asiatica mosaic virus* (PlAMV) 之呈色結果。

Fig. 1. Direct tissue blotting revealing presence of *Plantago asiatica mosaic virus* (PlAMV) in different parts of symptomatic lily plant but not in those of healthy plant. D: Diseased tissue; H-CK: Healthy control.

蝶蘭之 *Cymbidium mosaic virus* (CymMV)、菸草之 *Potato virus* X (PVX)、百子蓮之 *Nerine virus* X (NVX)，以及感染百合之 *Potyvirus* 屬病毒 (*Lily mottle virus*; LiMV)，於 Indirect ELISA 及西方轉漬法中進行反應，以測試 PlAMV-LV1 多元抗體之檢測專一性。

於 RT-PCR 法中，以 PlAMV-cpup/PlAMV-cpdw 引子對，檢測 PlAMV 罹病組織 (包括 Gracia-LV1、ConcaDor 及 Manissa 等百合品系之罹病種球組織)，以及上述不同病毒之罹病組織。RT-PCR 方法設定反應程序如上所述。

結果

PlAMV-LV1 病毒鞘蛋白分子選殖、定序分析及專一性檢測

本研究依據 GenBank 已登錄之 PlAMV 病毒核酸序列所設計之 PlAMV-cpup 及 PlAMV-cpdw 引子對，應用於 PlAMV 核酸分子之 RT-PCR 檢測，由進口種球 (LV1) 檢出有 PlAMV 之罹病組織所純化之全量核酸以此引子對進行 RT-PCR 反應，結果可增幅出與預估值相符大約 933 bp 之核酸片段 (圖 2)，經核苷酸定序結果顯示其具有病毒之核酸分子特性，其中對應鞘蛋白基因為 621 bp，並與日本學者於 GenBank 上已登錄之百合 *Plantago asiatica mosaic virus* 分離株 (acc. no. AB360794.1) 之鞘蛋白胺基酸序列高達 93% 的相同度 (identity)。此鞘蛋白核酸序列分析結果顯示由進口百合所分離得之病毒核酸片段乃同為 *Potexvirus* 屬之 PlAMV 病毒的核酸分子。

另以 PlAMV-cpup 及 PlAMV-cpdw 引子對應用於由 Gracia、ConcaDor 以及 Manissa 品系之百合 PlAMV 罹病種球組織之病毒核酸分子增幅時，均可成功增幅出包含 PlAMV 鞘蛋白序列在內預估 933 bp 之核酸片段 (圖 2)，進一步將此等核酸片段選殖與定序分析結果，均含有 PlAMV 之分子特性 (結果未出示)。此引子對與其他受測的 *Potexvirus* 病毒 (包括 LVX、CVX、CymMV、PVX、NVX 等) 以及百合 LiMV 並無此 933 bp 核酸片段反應 (圖 2)，結果顯示 PlAMV-cpup 及 PlAMV-cpdw 引子對具有可專一性地檢出 PlAMV 核酸分子之檢測效率。

病毒鞘蛋白表現與多元抗體製備、血清檢測效益

經由 *Nco*I/*Xho*I 所切取 576 bp 大小的 PlAMV-LV1 CP 部分片段次選殖於 pET28b (+) 表現載體並於 *E. coli* 宿主中進行蛋白表現誘導，進而獲得分子量約為 21 kDa 之表現蛋白。此表現蛋白經兔免疫注射後製備出對應 PlAMV-LV1 CP 的多元抗體 (#184)，可應用於不同的血清檢測法包括 ELISA (表 1)、SDS-

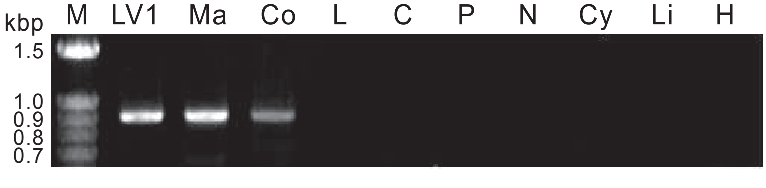

圖 2.　利用 PlAMV-cpup/PlAMV-cpdw 引子對於反轉錄 - 聚合酶鏈鎖反應中進行 *Plantago asiatica mosaic virus* (PlAMV)、不同 *Potexvirus* 病毒及 *Lily mottle virus* 之核酸分子檢測。行 M：核酸分子量標幟；行 LV1、Ma 及 Co 分別為 Gracia-LV1、Manissa 及 ConcaDor 百合之 PlAMV 罹病組織；行 L：*Lily virus* X；行 C：*Cactus virus* X；行 P：*Potato virus* X；行 N：*Nerine virus* X；行 Cy：*Cymbidium mosaic virus*；行 Li：*Lily mottle virus*；行 H：健康百合葉片。

Fig. 2.　Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of the *Plantago asiatica mosaic virus* (PlAMV), different potexviruses and *Lily mottle virus* using the primer pair PlAMV-cpup/PlAMV-cpdw primers. Lane M: molecular marker; Lane LV1, Ma and Co, PlAMV-infected lily tissue of Gracia-LV1, ConcaDor and Manissa, respectively; and lane L: *Lily virus* X; lane C: *Cactus virus* X; lane P: *Potato virus* X; lane N: *Nerine virus* X; lane Cy: *Cymbidium mosaic virus*; lane Li: *Lily mottle virus*; lane H: healthy tissue of lily. The predicted size of DNA fragments amplified from PlAMV-infected tissue was 933 bp by PlAMV-cpup/PlAMV-cpdw primers.

免疫擴散反應法 (圖 3)、西方轉漬法 (圖 4)、以及直接組織轉漬法 (圖 1) 等。於 Indirect ELISA 法中，將 #184 進行免疫球蛋白 IgG 純化後，以 1 mg mL^{-1} 之濃度進行檢測，結果顯示 #184 IgG 於稀釋 1,000 倍下有最佳的檢測效率 (結果未出示)。於 SDS-免疫擴散反應法中的結果顯示，#184 可與百合病組織以及接種至白藜的單斑病組織產生免疫沉澱反應，且彼此間的沉澱線相融合，呈現同源血清反應 (圖 3)。以直接組織轉漬法 (DTB) 進行免疫檢測，以 BCIP/NBT 呈色液反應後，植株不同部位之 PlAMV 罹病組織呈現藍黑色染色區，與健康對照的組織顏色容易辨別區分，惟病毒於濃度較低或分布不均之部位時，染色結果呈現點狀不規則的分布 (如鱗片球組織) (圖 1)。

PlAMV 多元抗體於 Indirect ELISA (表 1) 及西方轉漬法 (圖 4) 中，與不同來源之 *Potexvirus* 屬病毒 (包括 LVX、CymMV、CVX、NVX、PVX) 及感染百合之 *Potyvirus* 屬病毒 (LiMV) 等，均只與 PlAMV 抗原組織產生正反應，顯示本研究所自製之 PlAMV-LV1 多元抗體於此等血清法的檢測中，具有專一性檢測之效益。

不同部位組織以及檢測法對百合 PlAMV 檢出率之比較

病毒檢測方法、百合品種與百合不同部位組織對百合 PlAMV 檢出率之影響，經三因子變異數分析後 (Three-factor ANOVA)，結果顯示本研究所比較的百合品種 ConcaDor 及 Manissa 兩個品系對病毒檢測而言，不具顯著差異性 (結果未顯示)。因此綜合兩品種受測植株之不同部位組織所獲得之病毒檢出率，進一步針對病毒檢測方法 (ELISA 及 DTB 法)，以二因子變異數分析 (Two-factor ANOVA) 其影響性，其結果顯示不同部位組織和檢測方法 (plant portions × detection Method) 二因子間彼此具交互作用 ($F_{3,3}$ = 26.4, P < 0.0001) (表 2)，即不同部位組織與檢測方法相互間對 PlAMV 檢出率具有顯著差異性的影響，並非單一因子可影響此病毒之檢出率。當不同部位組織和檢測方法兩種因子間交互組合下所獲得之病毒檢出率差異，以單獨用 DTB 法檢測時，對百合莖部、葉部及根系所獲得者最高，介於 98.5% ± 7.1%–100% (表 3)；其次爲以 ELISA 對莖部之檢出，以及 DTB 對鱗片球和 ELISA 法對根系之病毒檢出率效果，介於 89.1% ± 20.8%–89.7% ± 18.4% 之間；而單獨以 ELISA 對鱗片球所得之病毒檢出率最低，爲 15.8% ± 25.4% (表 3)。

表 1. *Plantago asiatica mosaic virus* (PlAMV) 及 *Lily mottle virus* (LiMV) 抗體於間接酵素連結免疫吸附法中交互檢測不同病毒抗原。

Table 1. Reciprocal cross reactivities of antisera produced against *Plantago asiatica mosaic virus* (PlAMV) or *Lily mottle virus* (LiMV) with their respective antigens and others determined by indirect enzyme-linked immunosorbent assay[z].

	ELISA reading (A_{405nm})[y]	
Antigen[x]	PlAMV	LiMV
PlAMV 1	3.44	0.12
PlAMV 2	2.96	0.13
PlAMV 3	2.75	0.14
PlAMV-LL	3.24	0.13
CymMV	0.03	0.06
CVX	0.03	0.04
LVX	0.08	0.09
NVX	0.04	0.09
PVX	0.03	0.06
LiMV	0.03	2.18
H-Lily	0.05	0.14
H-quinoa	0.04	0.09

[z] Indirect ELISA was conducted to compare the serological relatedness between PlAMV and LiMV infecting lilies and other potexviruses. Immunoglobulins of the tested antisera were diluted at 1/1000 ratio to react with antigens which was diluted at 1/30 ratio.

[y] Reactivities are shown as the absorbance readings (A_{405nm}) taken 40 min after addition of enzyme substrate solution. The absorbance values are an average of two replicate wells. Those reactivities lower than two times of the healthy control (A_{405nm}) are considered as negative reactions.

[x] Antigens of PlAMV isolates (1–3) obtained from diseased lily tissues and PlAMV-LL from the local lesions of PlAMV on *Chenopodium quinoa*, different *Potexvirus* isolates including *Cymbidium mosaic virus* (CymMV), *Cactus virus* X (CVX), *Lily virus* X (LVX), *Nerine virus* X (NVX) and *Potato virus* X (PVX),and the *Potyvirus* isolate-*Lily mottle virus* (LiMV) were used. Healthy lily tissues (H-Lily) and *C. quinoa* (H-quinoa) were used as control antigens.

整體而言，無論是於哪一種部位組織，以

圖 3. 利用細菌表現之車前草嵌紋病毒 (*Plantago asiatica mosaic virus*; PlAMV) 鞘蛋白 所製備之多元抗體於 SDS-免疫擴散法之反應。#184：PlAMV 多元抗血清；D1：百合 PlAMV 罹病組織；LL：奎藜葉片上之 PlAMV 單斑；HL、HC：健康百合及奎藜葉組織；B：KPB 緩衝液。

Fig. 3. Sodium dodecyl sulfate (SDS)-immunodiffusion test of the antiserum produced against bacterial expressed coat protein of *Plantago asiatica mosaic virus* (PlAMV). The central well was filled with antiserum (#184) against PlAMV. The peripheral wells were filled with SDS-treated antigens including D1, the PlAMV-infected lily tissue; LL, local lesions on *Chenopodium quinoa* caused by PlAMV; HL & HC, the healthy tissues of lily and *C. quinoa*, respectively; and B, KPB buffer.

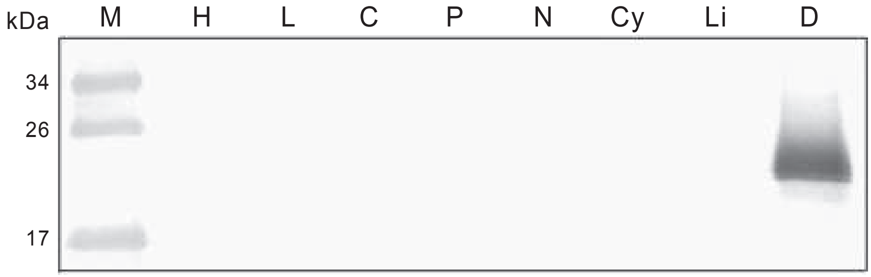

圖 4. 應用細菌表現蛋白所免疫之車前草嵌紋病毒 (*Plantago asiatica mosaic virus*; PlAMV) 抗血清以西方轉漬法檢測PlAMV、不同*Potexvirus*病毒及*Lily mottle virus*之效果。行M：蛋白質分子量標幟；行H：健康百合葉片；行 L：*Lily virus* X；行 C：*Cactus virus* X；行 P：*Potato virus* X；行 N：*Nerine virus* X；行 Cy：*Cymbidium mosaic virus*；行 Li：*Lily mottle virus*；行 D：百合 PlAMV 罹病組織。

Fig 4. Western blotting of the antiserum produced against bacterial expressed coat protein of *Plantago asiatica mosaic virus* (PlAMV) for the detection of PlAMV, different potexviruses and *Lily mottle virus*. Samples were reacted to the 1000×-diluted antiserum to PlAMV. Lane M: protein marker; lane H: healthy tissue of lily; lane L: *Lily virus* X; lane C: *Cactus virus* X; lane P: *Potato virus* X; lane N: *Nerine virus* X; lane Cy: *Cymbidium mosaic virus*; lane Li: *Lily mottle virus*; and lane D: PlAMV-infected lily tissue.

DTB 法所得之病毒檢出率均高於 ELISA 所檢出者 (表 3)。針對百合植株地下部的種球部位之檢測，無論以 ELISA 或 DTB 法檢測所得之病毒檢出率，取樣根系檢測之結果均顯著地高於取樣鱗片組織檢測者；尤其當以 ELISA 法配合種球鱗片組織做為取樣點時所得之病毒檢出率乃最低 (15.8% ± 25.4%)，但此取樣點若以 DTB 法進行檢測，則可以顯著地提昇病毒檢出率達 89.3% ± 25.3% (表 3)。若針對植株地上部的莖與葉片組織作檢測，以莖部爲取樣點所得之病毒檢出率均高於葉片組織者 (表 3)。

表 **2.** 不同檢測方法及百合部位組織以二因子變異數分析其對 *Plantago asiatica mosaic virus* 檢出率之交互作用情形。

Table 2. Effect of detection methods and different portions of lily plants on virus detection rate of *Plantago asiatica mosaic virus* by two-factor ANOVA[z].

Treatment[y]	DF[x]	F Ratio	Prob > F
Plant portion	3	46.3012	< 0.0001*
Detection Method	1	97.5262	< 0.0001*
Plant portion x Detection Method	3	26.4029	< 0.0001*

[z] Data of detection percentage of *Plantago asiatica mosaic virus* were analyzed by SAS JMP 10 (SAS Institute Inc., USA).
[y] Four portions of lily plant including roots, bulb scales, stem and leaves were sampled for detection. Two detection methods including indirect ELISA and direct tissue blotting were conducted. Plant portion × Detection Method represents the interaction between these two factors.
[x] DF, degree of freedom.
* Values are significant differences among levels of treatment at $P = 0.05$ according to the two-factor ANOVA.

表 **3.** 比較 Indirect ELISA 及直接組織轉漬法於不同百合部位組織所測得之 *Plantago asiatica mosaic virus* 檢出率。

Table 3. Comparison of the detection rate of *Plantago asiatica mosaic virus* from different parts of lily plants by the indexing methods of indirect enzyme-linked immunosorbent assay and direct tissue blotting.

Detecting method/Plant portion	Detection rate (%)[z]
DTB	
Leaf	99.5 ± 2.4 a[y]
Stem	100 a
Root	98.5 ± 7.1 a
Bulb scales	89.3 ± 25.3 ab
ELISA	
Leaf	76.3 ± 30.7 b
Stem	89.8 ± 18.4 ab
Root	89.1 ± 20.8 ab
Bulb scales	15.8 ± 25.4 c

[z] The detection rates (%) [(No. positive samples/No. total samples) × 100%] of each plant portion were compared by the methods of indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and direct tissue blotting (DTB).
[y] Means with the same letter are not significantly different from each other at $P = 0.05$ according to Tukey HSD test (Tukey 1953).

討論

目前台灣的百合種球大多仰賴國外進口，病毒可能隨帶毒種球而引進國內，造成國內百合栽植與生育品質之風險。本研究由進口百合種球攔截到的罹病種球中所分離選殖到的病毒核酸，經核酸序列定序分析後確認爲 PlAMV 的分離株。進一步以罹病組織的全量核酸爲模版進行病毒鞘蛋白基因增幅與選殖，於細菌生合成系統中成功地獲得病毒的鞘蛋白表現蛋白供作抗原來源，所製備成的 PlAMV-LV1 多元抗體可實際應用於 ELISA、SDS-免疫擴散反應、西方轉漬法及直接組織轉漬法 (DTB) 等血清檢測上。而依據 GenBank 上已登錄之 PlAMV 核酸序列，所設計可增幅包含全長度鞘蛋白基因序列之引子對 PlAMV-cpup/PlAMV-cpdw，於本研究中除可成功應用於 Gracia 百合品系之 PlAMV-LV1 核酸片段大小 933 bp 的增幅外，亦可成功用於 ConcaDor 及 Manissa 等品系之百合罹病組織之 PlAMV 檢測，而不與其他受測 potexviruses 及 LiMV 反應，顯示其亦具有專一性檢測 PlAMV 之效益。因此 PlAMV-cpup/PlAMV-cpdw 引子對除可用於 PlAMV 病毒之核酸分子檢測鑑定之需外，亦可進一步應用於此病毒不同分離株之 CP 增幅而進一步進行選殖與定序鑑定，強化了對此病毒檢定與分類鑑定之準確度。本研究針對 PlAMV 血清與核酸檢測試劑之開發成功，使國內首度具有自主檢定此病毒的有效試劑，進而能加以應用於此病毒檢測技術的開發。

本研究以 PlAMV-LV1 多元抗體於探討應用不同血清方法對百合 PlAMV 檢出率的影響上，結果顯示本研究中所使用的 ConcaDor 及 Manissa 兩個百合品系對病毒檢測不具顯著差異性之影響 (結果未顯示)。國內栽培之百合品系多樣化，百合品系對 PlAMV 檢出率之真正影響性尚需更多品種之比較以獲得更明確而客觀之結果。本研究中，檢測方法與植株不

同取樣部位具有交互作用且顯著地影響病毒檢出率之結果，於不同百合植株部位組織包括莖部、葉部、鱗片組織及根系，無論是取哪一種部位組織，以 DTB 法所得之病毒檢出率均顯著地高於 ELISA 所檢出者。直接組織轉漬法 (direct tissue blotting；DTB，或稱 direct tissue blot immunioassay；DTBIA，tissue-blot immunoassay；TBIA) 已成功應用於多種植物病毒之快篩檢測 (Lin *et al*. 1990; Srinivasan & Tolin 1992; Garnsey *et al*. 1993; Makkouk & Kumari 1996; D'Onghia *et al*. 2001; Korkmaz 2002; Fegla *et al*. 2009)，且其檢測效率與敏感度優於 ELISA 法者已有見諸其他不同作物病毒的報告，包括 *Impatiens* 作物上的 *Tomato spotted wilt virus* (Hsu & Lawson 1991)、蘭花之 *Cymbidium mosaic virus* (Hsu *et al*. 1992)、柑橘之 *Citrus tristeza virus* (Garnsey *et al*. 1993)、以及百合之 *Lily symptomless virus* (Hsu *et al*. 1995) 等，而筆者以往研究結果也顯示夜來香 *Tuberose mild mottle* 的種球檢測，病毒檢出率以 DTB 法之結果顯著地優於 ELISA 檢出者 (Chen & Chang 1999)。DTB 法的取樣方便，同樣適合於大量樣品的快速篩檢 (Hsu *et al*. 1992)，在病毒檢出率等同或是優於 ELISA 的前提下，為一種更為簡便而有效率的血清檢定方式，尤其用於此等以種球繁殖的球根花卉之病毒檢測上。

以百合植株地下部之種球為取樣標的時，若選取種球鱗片為取樣點進行檢測，則需配合 DTB 法，方可以顯著地提昇病毒檢出率達。以同為種球上的鱗片組織與根系而言，無論以 ELISA 或是 DTB 法進行檢測，由根系取樣所獲得之病毒檢出率均顯著地高於鱗片組織，此結果顯示根系取樣對於病毒檢出率為最穩定而適於百合種球部位檢測 PlAMV 病毒之需。日本學者 Sugiyama *et al*. (2008) 所開發之四種百合病毒核酸檢定試劑中，亦採取百合球根之根系進行 LiMV、LSV、CMV 及 PlAMV 等病毒之核酸檢測以提升其檢出病毒之效益。而地上部的莖部與葉片組織，以莖部為取樣點所得之病毒檢出率均高於葉片組織者，因此地上部植株的取樣點採以莖部組織配合 DTB 法可快速而準確地進行百合植株的 PlAMV 檢定。

PlAMV 是一種寄主範圍廣的 *Potexvirus* 病毒，依據國外之報告，PlAMV 原始發現於車前草，其他天然寄主尚包括有南天竹、歐洲櫻草、百合屬之胭脂花，以及天女報春花等。以車前草而言，此植物是台灣田間或路邊常見之野生性植物之一，若 PlAMV 隨百合種球進口引進國內，則存在有被 PlAMV 感染之風險而造成病毒在本地之存活能力。因此，PlAMV 檢測試劑的開發成功，未來將可有效應用於監測國內車前草是否帶有此病毒，預防可能的天然寄主感染源以杜絕 PlAMV，進而維護國內百合生產的安全性。

近年來國內之百合種球來源，每年由歐洲的荷蘭、及南半球的智利、紐西蘭等國進口，以因應全年生產百合切花之需要 (農委會農產貿易統計查詢系統，http://agrapp.coa.gov.tw/TS2/ TS2Jsp/TS20202.htm)。PlAMV 目前之報告見諸於前蘇聯、日本、美國及荷蘭等國；台灣的百合種球主要來自國外進口，以目前國外已有報導 PlAMV 有發生於百合上，因此對於進口的百合種球，國內若能具有可自主檢測 PlAMV 之檢測試劑與提升病毒準確度之檢定技術，則可應用予此病毒之檢定以降低或防杜病毒可能隨種球引入台灣發生病毒病害的風險。

本研究所開發之 PlAMV-LV1 抗血清，針對 PlAMV 之檢測具有高專一性，而且於免疫檢測法中應用 DTB 法，針對種球根系的採樣所得之病毒檢出率顯著地高於種球鱗片組織取樣的檢出，尤其種球根系的少量取樣並不會影響到種球的生長效率，加上 DTB 法具有方便採樣、檢測快速的特性，其對 PlAMV 的檢出率又顯著地高於 ELISA 法，因此對於百合植株之種球部位的 PlAMV 病毒檢測，根系取樣配合 DTB 法可提供更準確的病毒檢定。本研究之結果可提供於未來針對進口百合種球與田間百合植株為對象而建立的 PlAMV 檢定模式之參考，以縮短檢定時間與強化檢防疫效益。

引用文獻

Blake, M. S., K. H. Johnston, G. I. Russell-Jones, and

E. C. Gotschlich. 1984. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. Anal. Biochem. 136:175–179.

Chang, C. A., M. J. Lin, C. C. Chen, T. C. Deng, and J. Y. Liao. 2001. Molecular evidence for the infection of *Strawberry latent ringspot virus* in lily. Plant Pathol. Bull. 10:55–64. (in Chinese with English abstract)

Chen, C. C. and C. A. Chang. 1999. The improvement for the detection of tuberose mild mosaic potyvirus in tuberose bulbs by temperature treatment and direct tissue blotting. Plant Pathol. Bull. 8:83–88. (in Chinese with English abstract)

Chen, C. C., T. Hsiang, F. L. Chiang, and C. A. Chang. 2002. Molecular characterization of *Tuberose mild mosaic virus* and preparation of its antiserum to the coat protein expressed in bacteria. Bot. Bull. Acad. Sin. 43:13–20.

Chiang, F. L., C. A. Chang, Y. H. Cheng, and C. C. Chen. 2011. Serological and molecular identification of *Nerine virus* X infecting Africa lily (*Agapanthus africanus* L.) and development of its detection techniques. J. Taiwan Agric. Rec. 60:89–100.

Clark, M. F. and A. N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34:475–483.

Cohen, J., A. Gera, and G. Loebenstein. 1995. *Strawberry latent ringspot virus* in lilies. Eur. J. Plant Pathol. 101:217–219.

Derks, A. F. L. M. 1995. Lily. p.313–321. *in*: Virus and Virus-Like Diseases of Bulb and Flower Crops. (Loebenstein, G., R. H. Lawson, and A. A. Brunt, eds.) John Willey & Sons. West Sussex, United Kingdom. 543 pp.

D'Onghia, A. M., K. Djelouah, K. D. Frasheri, and O. Potere. 2001. Detection of *Citrus psorosis virus* by direct tissue blotting immunoassay. J. Plant Pathol. 83:139–142.

Fegla, G. I., M. A. I. Kawanna, and M. M. Fath-Allah. 2009. Detection of pea seed-borne mosaic virus (PSBMV) in individual and grouped samples by indirect ELISA and tissue blot immunoassay, TIBA. Ann. Agric. Sci. 54:449–460.

Garnsey, S. M., T. A. Permar, M. Carmbra, and C. T. Henderaon. 1993. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of citrus tristeza virus (CTV). p. 39–50. *in*: Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologist. (Moreno, P., J. V. da Graca, and L. W. Timmer. eds,) Riverside, CA.

Hughes, P. L., F. Harper, M. T. Zimmerman, and S. W. Scott. 2005. *Nandina mosaic virus* is an isolate of *Plantago asiatica mosaic virus*. Eur. J. Plant Pathol. 113:309–313.

Hsu, H. T., J. Y. Kim, and R. H. Lawson. 1995. Purification of lily symptomless carlavirus and detection of the virus in lilies. Plant Dis. 79:912–916.

Hsu, H. T. and R. H. Lawson. 1991. Direct tissue blotting for detection of tomato spotted wilt virus in Impatiens. Plant Dis.75:292–295.

Hsu, H. T., D. Vongsasitorn, and R. H. Lawson. 1992. An improved method for serological detection of Cymbidium mosaic potexvirus in orchids. Phytopathology 82:491–495.

Komatsu, K., Y. Yamaji, J. Ozeki, M. Hashimoto, S. Kagiwada, S. Takahashi, and S. Namba. 2008. Nucleotide sequence analysis of seven Japanese isolates of *Plantago asiatica mosaic virus* (PlAMV): a unique potexvirus with significantly high genomic and biological variability within the species. Arch. Virol. 153:193–198.

Korkmaz, S. 2002. Application of direct tissue blot immunoassay in comparison with DAS-ELISA for detection of Turkish isolates of Citrus Tristeza Closterovirus (CTV). Turk. J. Agric. For. 26:203–209.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. Nature 227:680–685.

Li, R. H., F. W. Zettler, D. E. Purcifull, and E. Hiebert. 1998. The nucleotide sequence of the 3'-terminal region of dasheen mosaic virus (*Caladium* isolate) and expression of its coat protein in *Escherichia coli* for antiserum production. Arch. Virol. 143:2461–2469.

Lin, N. S., Y. H. Hsu, and H. T. Hsu. 1990. Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. Phytopathology 80:824–828.

Makkouk, K. M. and S. G. Kumari. 1996. Detection of ten viruses by the tissue-blot immunoassay (TBIA). Arab. J. Plant Prot. 14:3–9.

Memelink, J., C. I. M.Van der Vlugt, H. J. M.Linthorst, A. F. L. M. Derks, C. J. Asjes, and J. F. Bol. 1990. Homologies between the genomes of a carlavirus (*Lily symptomless virus*) and a potexvirus (*Lily virus* X) from lily plants. J. Gen. Virol. 71:917–924.

Miglino, R., A. Jodlowska, and A. R. van Schadewijk. 2006. Detection and identification of a novel *Potexvirus* infecting *Allium* by paramagnetic beads ssRNA isolation and one tube RT-PCR assay with a new *Potexvirus* genus primer set. Acta Hortic. 722:285–292.

Ozeki, J., S. Takahashi, K. Komatsu, S. Kagiwada, K. Yamashita, T. Mori, H. Hirata, Y. Yamaji, M. Ugaki,

and S. Namba. 2006. A single amino acid in the RNA-dependent RNA polymerase of *Plantago asiatica mosaic virus* contributes to systemic necrosis. Arch. Virol. 151:2067–2075.

Purcifull, D. E. and D. L. Batchelor. 1977. Immunodiffusion tests with sodium dodecyl sulfate (SDS) -treated plant viruses and plant viral inclusions. Fla. Agric. Exp. Sta. Tech. Bull. 788:31–39.

Solovyev, A. G., V. K. Novikov, A. Merits, E. I. Savenkov, D. A. Zelenina, L. G. Tyulkina, and S. Y. Morozov. 1994. Genome characterization and taxonomy of *Plantago asiatica mosaic potexvirus*. J. Gen. Virol. 75:259–267.

Srinivasan, I. and S. A. Tolin. 1992. Detection of three viruses of clovers by direct tissue inmmunoblotting. Phytopathology 82:721.

Steel, R. G. D., J. H. Torrie, and D. A. Dickey. 1997. Principles and Procedures of Statistics. A Biometrical Approach. 3rd edition. WCB/McGraw-Hill Press. USA. 666 pp.

Sugiyama, S., C. Masuta, H. Sekiguchi, T. Uehara, H. Shimura, and Y. Maruta. 2008. A simple, sensitive, specific detection of mixed infection of multiple plant viruses using macroarray and microtube hybridization. J. Virol. Methods 153:241–244.

Takeuchi, T. and J. Sasaki. 2003. A potexvirus causing necrosis of lily, is one strain of *Plantago asiatica mosaic virus* (PLAMV). Jpn. J. Phytopathol. 69:329.

Tukey, J. W. 1953. The Problem of Multiple Comparisons. Mimeographs Princeton University. Princeton, N. J. USA. 215 pp.

Yamashita, K., Y. Fukui, and Y. Kanno. 2003. *Potexvirus* isolated from lily and primrose. Jpn. J. Phytopathol. 69:32.

Zheng, H. Y., J. Chen, M. F. Zhao, L. Lin, J. P. Chen, J. F. Antoniw, and M. J. Adams. 2003. Occurrence and sequences of *Lily mottle virus* and *Lily symptomless virus* in plants grown from imported bulbs in Zhejiang province, China. Arch. Virol. 148:2419–2428.

Serological Reagent Preparation and Improvement of Serological Method for the Detection of *Plantago asiatica mosaic virus* in Lily

Chin-Chih Chen[1,*], Yu-Ling Jhang[2], Bi-Yun Lin[2], Fen-Lang Chiang[2], Ying-Huey Cheng[3], and Ting-Chin Deng[4]

Abstract

Chen, C. C., Y. L. Jhang, B. Y. Lin, F. L. Chiang, Y. H. Cheng, and T. C. Deng. 2013. Serological reagent preparation and improvement of serological method to detect the *Plantago asiatica mosaic virus* in lily. J. Taiwan Agric. Res. 62(3):268–279.

In early 2011, a viral nucleic acid fragment belonging to the *Potexvirus* was detected by RT-PCR in imported lily bulb. The virus was identified as *Plantago asiatica mosaic virus* (PlAMV) and that was confirmed by nucleotide sequence analysis. A predicted 933-bp DNA fragment containing the full-length sequences of viral coat protein gene was amplified by RT-PCR with the primer pair PlAMV-cpup/PlAMV-cpdw (5'-CCGCGGCCGCCACACTACTC/5'-GGCCCACCAG ACTTTCACT), designed based on alignment of seven PlAMV nucleotide sequences in the database of GenBank. The deduced amino acid sequence of coat protein gene of the virus found in the imported lily bulb is 93% identical to that of the PlAMV (GenBank accession no. AB360794.1). The viral coat protein expressed by bacteria was prepared for antiserum production. The antiserum was shown to be able to specifically detect the PlAMV in indirect ELISA and western blotting. For detection of the virus distributed in lily plant, the indexing efficiency of direct tissue blotting (DTB) was significantly higher than that resulted in ELISA. The rates of detectable PlAMV from roots were significantly higher than those from the bulb scales. As well, different isolates of PlAMV CPs from various lily lines could be specifically detected by RT-PCR using the primer pair of PlAMV-cpup/PlAMV-cpdw. Accordingly, serological or molecular reagents developed in this study are both useful for virus-indexing; moreover, DTB is an effective serological method to improve the detection efficacy of PlAMV from lilies.

Key words: Virus disease of *Lilium* spp., *Plantago asiatica mosaic virus* (PlAMV), Antiserum preparation, Direct tissue blotting, RT-PCR detection.

Received: May 17, 2013; Accepted: August 7, 2013.
* Corresponding author, e-mail: chinzue@tari.gov.tw
1 Assistant Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
2 Research Assistant, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
3 Associate Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
4 Research Fellow, Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 62(3):280–288 (2013)
DOI: 10.6156/JTAR/2013.06203.08

丹參多倍體毛狀根誘導研究

夏奇鋁[1,*]　陳威臣[2]　曹進義[3]　李秋儀[4]　吳姿穎[4]

摘要

夏奇鋁、陳威臣、曹進義、李秋儀、吳姿穎。2013。丹參多倍體毛狀根誘導研究。台灣農業研究 62(3):280–288。

丹參 (*Salvia miltiorrhiza*) 為唇形科多年生草本植物，其根部含有脂溶性之丹參酮，是中醫治療心血管疾病的重要藥材。多倍體毛狀根具有快速生長以及二次代謝物含量較高之特性，具有大量生產植物二次代謝物之潛力。本研究的目的在建立一個高效率的丹參多倍體毛狀根誘導方法，進而從中篩選出高丹參酮產量之多倍體毛狀根系，作為離體培養大量生產丹參藥用成分之用。本研究以二倍體之丹參轉殖毛狀根為材料，培養於含有 2.5 mM 秋水仙素之 1/2 MS 鹽類固態培養基中，進行 2、4 及 6 d 不同天數的培養，結果顯示毛狀根之新根再生率以秋水仙素處理 2 d 者最高，達 80%；取再生新根以流式細胞儀進行染色體倍數檢測，並以 2 N 丹參植株之葉片作為參考值，標示為 2 C (complement quantity)，結果顯示以 2 d 及 4 d 處理得到之 4 C 毛狀根誘導率較高，在 52.4–55% 之間。此外，將毛狀根區分為根尖與根段兩種培植體，培養於含有 1.25 mM 及 2.5 mM 秋水仙素之液體培養基中，分別震盪培養 1、2 及 3 d，結果顯示根尖培植體之新根再生率及 4 C 毛狀根誘導率皆顯著高於根段培植體；秋水仙素 1.25 mM 及 2.5 mM 兩種濃度對毛狀根再生率之影響差異不顯著；但秋水仙素處理天數對新根再生率、4 C 毛狀根誘導率皆有顯著影響，新根再生率以 2 d 處理最佳，4 C 毛狀根誘導率則以 2 d 或 3 d 處理最佳。綜合以上之結果，顯示以二倍體丹參毛狀根之根尖作為多倍體誘導材料，在含有 2.5 mM 秋水仙素之固態或 1.25 mM 秋水仙素之液態培養基中培養 2 d，可得到平均高於 55% 之 4 C 毛狀根誘導率。進一步將為數 33 個之 4 C 毛狀根系進行 8 wk 培養，初步結果顯示，4 C 毛狀根系之平均生質量僅及 2 C 毛狀根之 0.49 倍，但 4 C 丹參毛狀根之隱丹參酮、丹參酮 I 與丹參酮 II A 的平均含量均較 2 C 毛狀根為高，隱丹參酮增加最高達 11.2 倍，丹參酮之總產量則提高至 2.6 倍。

關鍵詞：丹參、毛狀根、秋水仙素、多倍體、丹參酮。

前言

基因轉殖技術已普遍應用於作物的改良，其中利用農桿根群菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 轉殖育成之毛狀根 (hairy root) 被認爲是離體培養 (*in vitro* culture) 生產植物二次代謝物之新工具 (Zhou *et al*. 2011)。綜觀毛狀根培養之優點包括：毛狀根具有轉入之外源生長素基因，可以自發性的快速繁殖，因此培養毛狀根時毋須添加生長調節劑；毛狀根與懸浮細胞相較，爲一完整之根部器官，而器官培養 (organ culture) 較細胞培養 (cell culture) 具有較高的遺傳穩定性 (Flores *et al*. 1999)；再加上許多藥用植物的根部本來即爲植物二次代謝物的儲存之處，因此根部的二次代謝物含量常較其他組織或器官爲高；此外，與基轉植物相較，毛狀根須仰賴人工培養方能成活，並無生態安全與基因流佈之疑慮，因此利用毛狀根大

投稿日期：2013 年 6 月 28 日；接受日期：2013 年 8 月 9 日。
* 通訊作者：hsia@tari.gov.tw
[1] 農委會農業試驗所生物技術組研究員。台灣 台中市。
[2] 農委會農業試驗所生物技術組助理研究員。台灣 台中市。
[3] 農委會農業試驗所生物技術組聘用助理研究員。台灣 台中市。
[4] 農委會農業試驗所生物技術組計畫助理。台灣 台中市。

量生產植物二次代謝物的可行性逐漸受到重視 (Guillon *et al*. 2006; Ono & Tian 2011)。

利用轉殖毛狀根取代全株植物，以產業化方式大量生產高價之植物二次代謝物的生產策略，首先必須先確認毛狀根的生產效率，而毛狀根的生產效率可以從多方面去改進，例如高產根系的篩選、優化培養條件、添加誘引劑提高成分含量以及利用生物反應器大量培養等 (Kim *et al*. 2002; Georgiev *et al*. 2007; Srivastava & Srivastava 2007)。其中藉由提高毛狀根之遺傳倍體數，得到二次代謝物含量較高之多倍體毛狀根系即為生產改進的策略之一。多倍體主要是指相對正常染色體數目 (2 N) 倍加之植株，多倍體植株與二倍體植株相較，在外在型態上可以觀察到有葉面積增加、氣孔變大、根數目增加、植物總體積變大、花瓣數與花朵大小增加等改變，以及內在營養成分、二次代謝物成分及含量不同等改變。一些中草藥植物亦有利用多倍體化來提高藥用成分含量的育種策略 (Dhawan & Lavania 1996)。例如 De Jesus-Gonzalez & Weathers (2003) 將治療瘧疾之重要中藥──青篙 (*Artemisia annua*) 的毛狀根多倍體化，發現這些多倍體毛根系在成分含量及生長表現上與二倍體毛狀根有相當的差異，其中四倍體毛狀根之青篙素產量最高者為二倍體毛狀根的 6 倍，顯示多倍體毛狀根與多倍體植物同樣具有二次代謝物含量較高之特性，亦即利用多倍體化篩選成分含量提高之多倍體毛狀根系具有可行性，很可惜的是這篇研究只得到 4 個四倍體毛狀根系作為調查之用，這也凸顯想要篩選得到特殊的多倍體毛狀根系，首先必須先建立數量足夠的多倍體毛狀根系族群，以便從中選拔出具有目標特性之毛根系，因此建立一個高效率之多倍體毛狀根誘導方法為此一策略的基本要務。

在我們過去丹參毛狀根的研究中已經證實丹參毛狀根培養具有生產丹參酮之潛力，並可透過培養基調整與誘引劑的添加來提高丹參酮的產量 (Chen *et al*. 2008, 2010; Chan *et al*. 2012)。本研究利用二倍體之丹參毛狀根為材料，探討影響丹參多倍體毛根誘導之各種因素，用以建立一個高效率之多倍體毛狀根誘導技術，再由所得之多倍體丹參毛狀根系中篩選出高丹參酮產量特性之根系；此一技術除可利用於丹參多倍體毛狀根的誘導外，亦可做為其他藥用植物誘導多倍體毛狀根生產高價值植物二次代謝物之參考。

材料與方法

二倍體丹參毛狀根培養條件

丹參毛狀根為丹參 (*Salvia miltiorrhiza*) 葉片經由農桿根群菌 R1601 感染所得 (Lin 2006)，毛狀根培養於含有 B5 鹽類配方 (Gamborg *et al*. 1968)、3% 蔗糖與 0.9% Bacto agar 之培養基。上述基本培養基並作為秋水仙素處理後之恢復培養基。培養容器為直徑 9 cm 培養皿，每皿含 25 mL 培養基，毛狀根於黑暗環境中培養，每 4 wk 繼代一次。

秋水仙素誘導多倍體毛狀根試驗

固態培養基誘導：誘導培養基之成份為 1/2 MS 鹽類配方 (Murashige & Skoog 1962) 添加 2 mg L^{-1} benzyladenine (BA)、0.2 mg L^{-1} α-naphthaleneacetic acid (NAA)、3% 蔗糖與 0.9% Bacto agar，培養基於高壓滅菌後膠體未凝固前加入秋水仙素溶液，使培養基中秋水仙素濃度為 2.5 mM，再將培養基分裝於培養皿。誘導多倍體毛狀根所使用之材料為切取自於基本培養基中生長 2 wk 之二倍體毛狀根，長約 1–1.5 cm 之新根尖，每皿接種 10 條培植體，每一處理共接種 8–10 皿。毛狀根於含有秋水仙素之誘導培養基中分別培養 2、4 及 6 d 後，繼代於基本培養基中觀察新根的長出，每 4 wk 繼代一次。

液態培養基誘導：切取於固態基本培養基中生長 2 wk，長約 2–3 cm 之毛狀根作為接種材料，但將接種之毛狀根區分為根尖及其後之根段兩種培植體，根尖與根段培植體皆各長約 1–1.5 cm。液體培養基之成分同上述之基本培養基但未加入凝膠物質，培養基在滅菌後再加入秋水仙素溶液，使培養液中秋水仙素濃度為 1.25 mM 及 2.5 mM。培養容器為 125-mL 三角瓶，內裝有 10 mL 培養液，每瓶接種 20 條培植體，每一處理共培養 3 瓶。培養瓶於

25℃黑暗環境中利用往復式震盪培養器以 70 rpm 分別震盪培養 1、2 及 3 d 後，將培植體繼代回固態之基本培養基中。

流式細胞儀 (Flow cytometry) 檢測倍體數

切取於固態基本培養基中培養 4 wk 後之再生新根，根長約 1 cm，加入 0.4 mL UV CyStain Precise T 萃取緩衝液 A (Partec, Germany)，再以解剖刀將組織切碎，切碎後以過濾膜過濾，於過濾液中添加 0.8 mL Partec Cystain Precise T 緩衝液 B 進行 3 min 染色，每一毛狀根取樣兩次，以流式細胞儀 (Partec, Germany) 分析系統分析 5,000 個細胞核 DNA 量。流式細胞儀數據以 2 N 丹參植株之葉片作爲參考值標示爲 2 C (complement quantity)。

將流式細胞儀檢測爲 4 C 之根系分別編號，並重新接種於基本培養基中，每一編號毛狀根共接種兩皿，每皿接種 6 個根尖，8 wk 後調查毛狀根之鮮、乾重與丹參酮成分含量。

丹參酮成分萃取與含量分析

將乾燥之毛狀根磨碎，以二氯甲烷：甲醇 = 1：4 溶劑進行超音波震盪萃取 30 min 後收集濾液，殘渣再萃取一次後將兩次濾液合併濃縮，以甲醇定容後以 0.45 μm 濾膜過濾。HPLC 分析之條件爲流動相甲醇：四氫呋喃：冰醋酸：水 = 18：35：1：46，流速 1 mL min^{-1}，吸收波長 254 nm，分別檢測隱丹參酮 (cryptotanshinone; Crypto)、丹參酮 I (totanshinone I; Tan I)、丹參酮 IIA (totanshinone IIA; Tan IIA) 之含量，丹參酮類標準品購自中國藥品生物製品檢定所 (大陸)，純度爲 98.7% 以上。

統計分析方法

試驗採用完全逢機設計 (completely randomized design; CRD)，試驗所得資料經 SAS 8.2 (SAS Institute Inc. 2001) 套裝統計分析軟體進行 ANOVA 變方分析，若處理間差異顯著 (P < 0.05) ，則利用 Least Significant Difference test (LSD) 比較各處理平均值間之差異。

結果

丹參毛狀根於含有 2.5 mM 秋水仙素之固態培養基中分別培養 2、4 及 6 d 後繼代至基本培養基中培養，每 2 wk 調查一次新根長出之比率持續至第 8 wk，結果如表 1，顯示秋水仙素處理天數對於新根再生率、每個培植體長出的根數皆有顯著之影響 (P < 0.01) ，新根再生率及平均新根數均以 2 d 處理爲最佳，處理天數超過 2 d 之新根再生率及新根數皆明顯降低；但 4 d 與 6 d 秋水仙素處理間在新根再生率及新根數上並無明顯差異。此外藉由每 2 wk 調查一次持續至第 8 wk 的數據，可以觀察到新根長出之速率會隨著秋水仙素處理時間的延長而有差異，秋水仙素處理 2 d 之毛狀根在處理後 2 wk 內即長出新根者，佔總新根數的 71.3%；但處理 4 d 者則延至第 4 wk 才有較高比率之新根長出 (76.2%)；處理 6 d 之新根亦同樣有延遲長出之情形，亦即在第 4 wk 後才有較高比率之新根長出，但僅達 58.8%，再生新根延滯長出之情況更爲嚴重，至第 8 wk 時仍有 29.4% 比率之新根長出 (圖 1、表 1) 。再生之新根以流式細胞儀進行倍體數分析，結果如表 2，顯示多倍體之誘導率受到處理天數的影響顯著 (P < 0.01)，4 C 毛狀根產生之比

表 1. 以秋水仙素 2.5 mM 濃度處理不同天數對丹參毛狀根再生新根之影響。

Table 1. Effect of 2.5 mM colchicine incubation time on hairy root formation of *Salvia miltiorrhiza*.

Incubation of colchicine (d)	Total treated roots	Root formation (%)	No. of roots/ explant	% of root formation		
				2 wk	4 wk	8 wk
2	100	80.0 a[z]	0.80 a	71.3 ± 0.08	18.8 ± 0.12	10.0 ± 0.04
4	100	21.0 b	0.21 b	19.1 ± 0.09	76.2 ± 0.08	4.8 ± 0.04
6	80	21.3 b	0.21 b	17.7 ± 0.10	58.82 ± 0.03	29.4 ± 0.12

[z] Means in the column with different letters are significantly different (P < 0.05) by LSD test.

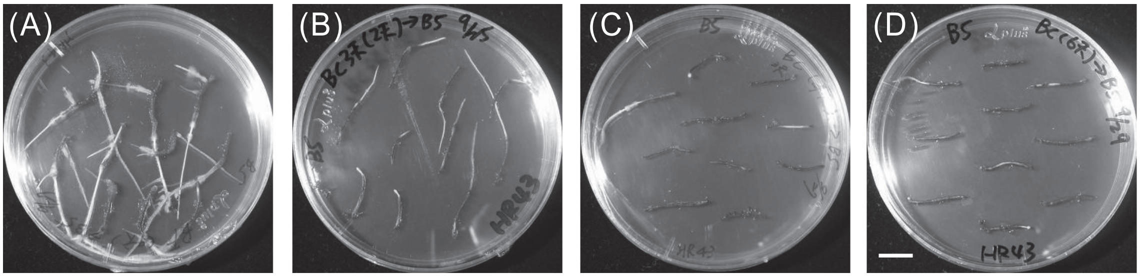

圖 1. 丹參毛狀根以 2.5 mM 秋水仙素處理不同天數，3 wk 後新根生長之情形。秋水仙素處理天數分別爲 (A) 對照組 0 d；(B) 2 d；(C) 4 d 及 (D) 6 d。

Fig. 1. Growth of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots three weeks after 2.5 mM colchicine treatment. Incubation days for colchicine treatment is (A) control, 0 day; (B) 2 days; (C) 4 days and (D) 6 days. Bar = 1 cm.

表 2. 以秋水仙素 2.5 mM 濃度不同天數處理對丹參毛狀根誘導多倍體之影響。

Table 2. Effect of 2.5 mM colchichine incubation time on polyploidy hairy root induction of *Salvia miltiorrhiza*.

		Ploidy (%)		
Incubation of colchicine (d)	Total roots examined	2 C	4 C	Stop growth
2	80	36.3 a[z]	55.0 a	8.8 b
4	21	33.3 a	52.4 a	14.3 b
6	17	41.2 a	17.6 b	41.2 a

[z] Means with different letters in the column are significantly different ($P < 0.05$) by LSD test.

率在秋水仙素 2 d 及 4 d 處理間差異並不顯著 (55% 及 52.4%)，但 6 d 處理之多倍體毛狀根誘導比率僅 17.6% 則明顯降低。此外，隨著秋水仙素處理天數增加，再生新根停止生長的比率亦隨之增高，再生新根在繼代後如停止生長，則未檢測其倍體數，三種天數處理中以處理 6 d 之新根停止生長比率最高，達 41.2%。長出之新根經檢測爲 4 C 者在繼代培養後亦發現部分根系有停止生長之情形，分別佔 2、4、6 d 處理之 4 C 毛狀根的 20.4、52.4、66.7% (資料未顯示)。

進一步將接種之毛狀根區分爲根尖及根段兩種培植體，於含有 1.25 mM 及 2.5 mM 兩種濃度秋水仙素之液態培養基分別處理 1、2、3 d，試驗結果之 ANOVA 分析顯示如表 3。秋水仙素濃度、處理天數及根培植體三種因子中，以處理天數、根培植體以及兩者之間的交感作用對再生新根的形成有極顯著之影響 ($P < 0.01$)；2 C 根系比率則分別受到處理天數 ($P < 0.01$)、以及秋水仙素與天數之交感 ($P < 0.05$) 顯著影響；4 C 根系比率則受到根培植體之顯著影響 ($P < 0.01$)。秋水仙素濃度在各項調查數據之主效應影響皆不顯著，僅在 2 C 毛狀根比率中顯示與天數具有交感效應 ($P < 0.05$)。將各種因子對多倍體毛狀根形成之結果列於表 4，整體而言，在再生新根的形成方面，根尖培植體較根段有較高之新根再生率，因根尖與根段之表現差異大，因此將根尖與根段之結果分別比較，根尖或根段培植體兩者之新根再生率及平均新根數皆明顯受處理天數之影響。比較兩種培植體產生 4 C 毛狀根的比率，根尖培植體明顯受到秋水仙素處理天數的影響，但根段則否。根段培植體在不同天數處理中其多倍體誘導率僅介於 13.1–24.7% 之間；但以根尖爲培植體配合秋水仙素 2 d 或 3 d 處理，可獲得最高之 4 C 毛狀根誘導率 (30.4–59.4%) 。在新根停止生長方面，秋水仙素處理天數及根培植體兩因子皆無顯著之影響，此點與固態培養 2–4 d 新根停止生長比率差異不顯著之結果相當吻合，推論秋水仙素處理時間若未長於 4 d 對新根停止生長比率不至造成影響。

丹參多倍體毛根系在外觀上大多具有較粗

表 3. 秋水仙素濃度、處理天數及不同根培植體對多倍體毛狀根誘導影響之變異數分析。

Table 3. ANOVA of explant types of root, concentration of colchicine and its incubation time on polyploidy induction of *Salvia miltiorrhiza* hairy root.

		Mean Square				
				Ploidy (%)		
Source	DF	Root formation (%)	No. of roots/explant	2 C	4 C	Stop growth
Day for colchicine (D)	2	12,912.5**	2.503**	4,826.1**	1,076.2	371.05
Con. of colchicine (C)	1	138.9	0.117	1,953.1	67.1	830.40
Explant type (E)	1	14,450.0**	0.087	1,509.3	4,908.5**	58.38
D × C	2	476.4	0.115	2,750.3*	303.3	159.85
D × E	2	1,287.5**	0.055	574.4	1,228.3	80.76
C × E	1	200.0	0.007	1,099.4	284.1	265.76
D × E × C	2	29.2	0.014	401.6	1,217.8	241.20

*, **significant at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

表 4. 秋水仙素處理天數及不同根培植體對多倍體丹參毛狀根形成之影響。

Table 4. Effect of colchicine incubation time and types of root explants on polyploidy induction of S*alvia miltiorrhiza* hairy root.

Root explant Colchicine (mM)	Treatment (d)	Root Formation (%)	No. root /explant	Roots analyzed	Ploidy (%) 2 N	4 N	Retardant
Tip							
1.25	1	98.3 a[z]	0.98 a	59	74.3 a	17.0 c	8.7 a
	2	66.7 c	0.67 c	40	34.0 bc	59.4 a	6.6 a
	3	36.7 d	0.37 d	22	50.2 bc	40.9 abc	8.9 a
2.5	1	85.0 ab	0.85 ab	51	64.9 a	23.5 bc	11.6 a
	2	71.7 bc	0.72 bc	43	62.1 ab	30.4 bc	7.5 a
	3	26.7 d	0.27 d	16	23.6 abc	45.8 ab	13.9 a
Section							
1.25	1	53.3 a	1.08 a	65	75.3 a	24.7 a	0.0 a
	2	30.0 bcd	0.48 bcd	29	70.2 a	13.1 a	0.0 a
	3	23.3 cd	0.30 cd	18	63.9 a	18.1 a	18.1 a
2.5	1	51.7 ab	0.8 ab	48	63.3 a	15.5 a	21.3 a
	2	40.0 abc	0.57 bc	34	64.4 a	23.6 a	12.0 a
	3	16.7 d	0.20 d	12	27.1 a	22.9 a	16.7 a

[z] Means with different letters in the same explant type are significantly different ($P < 0.05$) by LSD test.

之根徑、較少支根或較少之分支性，部分根系在培養後會呈現明顯之紅色，顯示其丹參酮含量的累積 (圖 2)。將流式細胞儀檢測為 4 C 之共 33 個多倍體毛根系重新繼代新培養基，培養 8 wk 後調查各根系之生質量及丹參酮含量，將對照組二倍體毛狀根與多倍體毛狀根系之平均值列於表 5。結果顯示多倍體毛狀根之生質量明顯較二倍體毛根為低，33 個 4 C 毛根系之平均生質量僅為對照組 2 C 毛狀根之 48.9%；但在丹參酮含量方面則發現 4 C 毛根系較對照 2 C 毛狀根明顯增加，其中以隱丹參酮含量增加最多，平均增加達 11.2 倍；丹參酮 I 與丹參酮 II A 含量方面平均皆增加達 2.6 倍，整體丹參酮產量則增加了 2.6 倍。

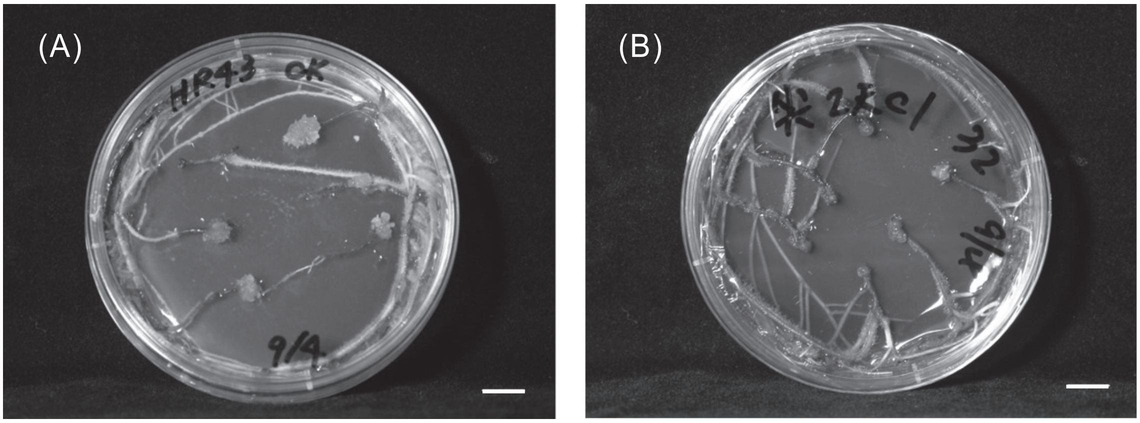

圖 2. 二倍體及四倍體丹參毛狀根繼代培養後 8 wk 生長之情形。(A) 二倍體；(B) 四倍體。

Fig. 2. Growth of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots 8 weeks after subculturing. (A) 2 C; (B) 4 C. Bar = 1 cm.

表 5. 不同倍體數丹參毛狀根系培養 8 wk 後之平均生質量與丹參酮含量比較。

Table 5. Comparison of 2 C and 4 C hairy root lines of *Salvia miltiorrhiza* on biomass and tanshinone production.

		Tanshinone[z] (mg g^{-1})				
Ploidy of hairy root	Dry weight (g L^{-1})	Crypto	Tan I	Tan IIA	SUM	Productivity (mg L^{-1})
2 C	6.40 ± 0.80	0.19 ± 0.03	0.33 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.60 ± 0.00	3.83
4 C[y]	3.13 ± 1.00	2.13 ± 1.09	0.87 ± 0.40	0.18 ± 0.12	3.18 ± 1.52	9.98

[z] Tanshinones include cryptotanshinone (Crypto), totanshinone I (Tan I) and totanshinone IIA (Tan IIA).
[y] Total 33 lines analyzed.

討論

已有許多報告指出多倍體植物可以增加二次代謝物的生產 (Dhawan & Lavania 1996)，但多倍體毛狀根是否能提高二次代謝物產量的影響，相關研究數量相當少，De Jesus-Gonzalez & Weathers (2003) 在青篙 (*Artemisia annua*) 多倍體毛狀根的研究則指出，四倍體毛狀根產出之 artemisinin 是二倍體毛狀根的 6 倍，但上述兩研究對於如何有效誘導多倍體毛狀根皆無詳述，僅 De Jesus-Gonzalez & Weathers (2003) 提到利用 0.25% 或 0.5% (6.25 mM 或 12.5 mM) 濃度之秋水仙素處理 7 d 效果最佳，但其 4 C 毛狀根誘導率只有 10% (4/40)，亦即僅獲得 4 個多倍體毛根系，推測可能與秋水仙素濃度過高以及處理時間過久有關，因此較不具作爲多倍體毛狀根誘導方法之參考價值。

一般而言，離體培養多倍體誘導效果會受到培植體、秋水仙素濃度與處理時間的共同影響 (Dhooghe *et al*. 2011)。綜合丹參多倍體毛狀根誘導之結果顯示，秋水仙素濃度影響並不顯著，這可能與本研究使用之濃度 1.25 mM 及 2.5 mM 差異不大有關；新根再生率及多倍體的誘導率主要是受到秋水仙素處理時間的影響，在表 2 中雖然顯示四倍體毛狀根誘導率在處理 2 d 與 4 d 間無明顯差異，以及在表 4 中顯示根尖培植體 2 d 與 3 d 處理間亦無明顯差異，但若將新根再生率計入，則各處理間之差異擴大，兩試驗皆以較短處理時間2 d 最適當，可得到較多之 4 C 毛狀根數並有建立較大之多倍體族群進行選拔。此外在誘導多倍體化的研究報告中鮮少比較在收穫時間上之差異，本研究經由持續追蹤秋水仙素處理後 8 wk 間新根長出之分佈比例，發現到秋水仙素處理時間延長會延滯新根長出時間，推測可能爲秋水仙素藥劑處理對新根的生長造成抑制作用，因此建議秋水素處理時間較長時，應該適當的延後新根收穫的時間，方可增加再生新根之獲

得。此外亦發現延長秋水素處理時間，再生新根停止生長之比例會增加。在離體培養誘導多倍體所使用的培植體方面，一般建議以具有高度分化能力者最佳，如金線連誘導多倍體的研究指出，以無菌播種後快速生長之根莖以及瓶苗之頂芽較莖節培植體有較高之多倍體誘導率 (Hsia *et al*. 2009, 2010)；本試驗比較根尖與根段兩種培植體，亦發現根尖之新根再生率及 4 C 毛狀根誘導率均明顯較根段培植體爲高，顯示培植體本身之細胞分裂能力與染色體加倍成功的比例有相關，因此在材料來源充足情況下，建議以切取根尖作爲多倍體誘導之材料較爲適當。

將流式細胞儀確認之 33 個 4 C 毛狀根系繼代於新培養基中，進行 4 C 毛狀根系第一次的 8 wk 固態培養，調查數據顯示 4 C 毛狀根在同樣培養期間內所收穫之生質產量明顯較 2 C 毛狀根爲低 (49%)，推測原因有二，一爲與 4 C 毛狀根生長速率較慢有關，此點可藉由延長培養時間確認多倍體毛狀根到達最高產量所需之時間來證實；二爲秋水仙素藥劑處理抑制根生長之效果仍持續影響，此點可經由多代培養後，比較各代間之生長差異是否不同得到解答，且如果秋水仙素對生長抑制的影響持續存在，則 4 N 毛狀根系的產量選拔應該經由多代培養後，亦即毛狀根系生長穩定後再加以選拔。從成分含量來看，4 C 毛狀根在三種丹參酮的含量上皆明顯較 2 C 毛狀根系爲高，或謂秋水仙素處理本身即具有誘引劑之效果，因此多倍體毛狀根二次代謝物含量得以提高，表 5 中之數據爲 4 C 毛狀根系繼代於不含秋水仙素培養基中之第一次培養，雖然培養基中已不含秋水仙素，但仍不能排除秋水仙素仍具有持續影響之效果，但在誘引劑不存在之培養基中經過多代培養後在進行成分選拔，理論上則可排除誘引劑影響之推論，若證實二次代謝物含量在多代培養後仍可維持不降，則可推論成分含量的提高爲染色體組遺傳改變所造成，而非秋水仙素的類誘引劑效果。在丹參 4 C 毛狀根系之二次代謝物含量提高方面，顯示丹參酮 I 與丹參酮Ⅱ A 以及隱丹參酮含量皆有增加，但以隱丹參酮含量增加最多，此結果與前人研究由二倍體及四倍體曼陀羅 (*Datura stramonium*) 植株誘導而來之不同倍體數毛狀根，在生物鹼頻譜分佈上與累積量上顯示有相當程度之不同的結果相類似 (Berkov *et al*. 2003)，亦即未來可藉由篩選特定成分表現較佳之根系作爲生產之用。目前 4 C 毛狀根的培養及篩選仍持續進行中，除比較各根系之生質產量與成分產率的不同外，並追蹤同一毛根系經多次繼代培養後其生長及各成分含量的穩定性之變化，結果將另行發表。

歸納丹參多倍體毛狀根誘導之結果，建議使用毛狀根之根尖做爲誘導培植體，以 1.25 mM 及 2.5 mM 濃度之秋水仙素處理 2 d，在處理後較短時間內即可獲得較多之再生新根數，以及較高之 4 C 毛狀根比率，且再生新根後續停止生長之比率亦較低，此一模式可做爲其他藥用植物誘導多倍體毛狀根之參考。

引用文獻

Berkov, S., A. Pavlov, P. Kovatcheva, P. Stanimirova, and S. Philipov. 2003. Alkaloid spectrum in diploid and tetraploid hairy root cultures of *Datura stramonium*. Z. Naturforsch. 58:42–46.

Chen, U. C., H. S. Chan, C. Y. Lee, C. Y. Tsao, J. C. Liu, Y. C. Lee, and C. N. Hsia. 2008. Production of tanshinones of S*alvia miltiorrhiza* in hairy root culture. J. Taiwan Agric. Res. 57: 305–326. (in Chinese with English abstract)

Chen, U. C., C. Y. Lee, H. S. Chan, C. Y. Tsao, and C. N. Hsia. 2010. Influence of metal ion and elicitor on hairy root growth and production of tanshinones of *Salvia miltiorrhiza*. J. Taiwan Agric. Res. 59: 49–60. (in Chinese with English abstract)

Chan, H. S., T. T. Lo, U. C. Chen, C. N. Hsia, and H. S. Tsay. 2012. Effect of nitrogen source on biomass and tanshinone production of *Salvia miltiorrhiza* in hairy root culture. J. Taiwan Agric. Res. 61:100–111. (in Chinese with English abstract)

De Jesus-Gonzalez, L. and P. J. Weathers. 2003. Tetraploid *Artemisia annua* hairy roots produce more artemisinin than diploids. Plant Cell Rep. 21:809–813.

Dhawan, O. P. and U. C. Lavania. 1996. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: A review. Euphytica 87:81–89.

Dhooghe, E., K. Van Laere, T. Eeckhaut, L. Leus, and J. Van Huylenbroeck. 2011. Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. Plant Cell Tissue

Organ Cult. 104:359–373.

Flores, H. E., J. M. Vivanco, and V. M. Loyola-Vargas. 1999. Radicle biochemistry: The biology of root-specific metabolism. Trends Plant Sci. 4:220–226.

Gamborg, O. L., R. A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell. Rep. 50:151–158.

Georgiev, M. I., A. I. Pavlov, and T. Bley. 2007. Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. Appl. Microbiol. Biotechnol. 74:1175–1185.

Guillon, S., J. Trémouillaux-Guiller, P. K. Pati, M. Rideau, and P. Gantet. 2006. Harnessing the potential of hairy roots: Dawn of a new era. Trends Biotechnol. 24:403–409.

Hsia, C. N., J. T. Huang, U. C. Chen, C. Y. Tsao, S. H. Liang, and S. S. Tsay. 2009. *In vitro* induction of polyploidy from rhizomes of *Anoectochilus formosanus*. J. Taiwan Agric. Res. 58:302–309. (in Chinese with English abstract)

Hsia, C. N., J. T. Huang, U. C. Chen, C. Y. Tsao, S. H. Liang, and H. S. Tsay. 2010. *In Vitro* induction of polyploidy from nodal explants of *Anoectochilus formosanus*. J. Taiwan Agric. Res. 59:165–176. (in Chinese with English abstract)

Kim, Y., B. Wyslouzil, and P. J. Weathers. 2002. Secondary metabolism of hairy root cultures in bioreactors. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 38:1–10.

Lin, J. F. 2006. Development of hairy root transformation system and its secondary metabolites production of *Salvia miltiorrhiza*. Master thesis, Department of Agronomy, National Chung Hsing University. Taichung, Taiwan. 76 pp. (in Chinese with English abstract)

Murashige, T and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473–497.

Ono, N. N. and L. Tian. 2011. The multiplicity of hairy root cultures: Prolific possibilities. Plant Sci. 180: 439–446.

Srivastava, S. and A. K. Srivastava. 2007. Hairy root culture for mass-production of high-value secondary metabolites. Crit. Rev. Biotechnol. 27:29–43.

Zhou, M. L., X. M. Zhu, J. R. Shao, Y. X. Tang, and Y. M. Wu. 2011. Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture. Appl. Microbiol. Biot. 90:1229–1239.

Polyploidy Hairy Roots Induction of *Salvia miltiorrhiza*

Chi-Ni Hsia[1,*], Uei-Chern Chen[2], Chin-Yi Tsao[3], Choi-Yi Lee[4], and Tzu-Ying Wu[4]

Abstract

Hsia, C. N., U. C. Chen, C. Y. Tsao, C. Y. Lee, and T. Y. Wu. 2013. Polyploidy hairy roots induction of *Salvia miltiorrhiza*. J. Taiwan Agric. Res. 62(3):280–288.

Salvia miltiorrhiza Bunge is a perennial herb of Labiatae Family. Its roots contain rich tanshinones and have been used for long history in traditional Chinese medicine to cure cardiology disease. Using fast growth hairy roots is becoming a new strategy for production of valuable secondary metabolites. Application of polyploidy hairy roots may provide an advanced approach to enhance *in vitro* secondary metabolite production. The objective of this study was to establish an efficient polyploidy induction method for *S. miltiorrhiza* to generate sufficient amounts of polyploidy hairy roots for selection of high medicinal content hairy root lines. Hairy roots induced from *in vitro* leaves of dipoloid *S. miltiorrhiza* plants were used as induction explants. Ploidy of regenerated roots derived from colchicine treatments were analyzed using a flow cytometry. A leaf from a 2 N plant was used as the control for flow cytometry which would indicate as 2 C (complement quantity). Root explants were cultured in a solid medium containing with 2.5 mM colchicine for 2, 4 and 6 days to induce polyploidy hairy roots. Treatment of 2-day-exposure colchicines had the highest root formation rate of 80%. The highest polyploidy induction rate of 52.4–55% was obtained from 2- and 4-day-exposure of colchicine. Furthermore, root explants of tips and sections were used as induction explants incubated in a liquid medium containing 1.25 mM and 2.5 mM colchicine for 1, 2 and 3 days to induce polyploidy. It was found that explant type and exposure duration of colchicine had significant effects on root formation and polyploidy induction rate however effect of colchicine concentration was found not significantly. The highest root formation rate was found from root tip explant for 2-day-exposure. The highest 4 C induction rates were found from either 2- or 3-day-exposure of the tip explant. In conclusion, root tips are more suitable explants than that of root sections for *in vitro* polyploidy induction. Root tip explant incubated in a solid medium containing 2.5 mM colchicines or in a liquid medium containing 1.25 mM colchicines for 2-day-exposure had the 4C hairy root induction rate higher than 55%. A total 33 lines of 4C hairy roots were subcultured to a new medium for 8 weeks of culture. The average biomass obtained from 4C hairy root lines showed only in 49% of the diploid hairy roots. In contrast, the average contents of cryptotanshinone, tanshinone I, and tanshinone IIA obtained from 4 C hairy root lines were all found higher than that of the diploid hairy roots. Moreover, an 11.2 folds increasing of the cryptotanshinone contents obtained from 4 C hairy root lines and making a 2.6 folds increasing for the total tanshinone production than that of the 2 C hairy roots.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge, Hairy root, Colchicine, Polyploidy, Tanshinone.

Received: June 28, 2013; Accepted: August 9, 2013.
[*] Corresponding author, e-mail: hsia@tari.gov.tw
[1] Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[2] Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[3] Contract Assistant Research Fellow, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.
[4] Research Assistants, Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, Taiwan, ROC.

Editorial Board

Editor-in-Chief

Yang, Chwen-Ming
Taiwan Agricultural Research Institute

Editors

Ann, Pao-Jen
Division of Plant Pathology, Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Chi-Chung
Department of Applied Economics, National Chung Hsing University

Chen, Chien-Chung
Division of Applied Zoology, Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Chiling
Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute

Chen, Chung-Li
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Chen, Fure-Chyi
Department of Plant Industry, National Pingtung University of Science and Technology

Chen, Su-Ming
Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering, National Taiwan University

Chien, Li-Hsien
Department of Applied Economics, National Chung Hsing University

Guo, Horng-Yuh
Division of Agricultural Chemistry, Taiwan Agricultural Research Institute

Hou, Feng-Nan
Department of Entomology, National Chung Hsing University

Huang, Chao-Chia
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Huang, Pung-Ling
Department of Horticulture & Landscape Architecture, National Taiwan University

Kao, Ching-Huei
Department of Agronomy, National Taiwan University

Ko, Wen-Hsiung
Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University

Lu, Hsiu-Ying
Taiwan Agricultural Research Institute

Ou, Shyi-Kuan
Division of Crop Science, Taiwan Agricultural Research Institute

Shen, Yuan
Department of Soil & Environmental Sciences, National Chung Hsing University

Su, Jeng-De
Department of Food Science, Tunghai University

Tsay, Hsin-Sheng
Graduate Institute of Biochemical Sci. & Technol., Chaoyang University of Technology

Tsay, Jyh-Rong
Taiwan Agricultural Research Institute

Tseng, Menq-Jiau
Department of Horticulture, National Chung Hsing University

Wang, Chan-Sen
Department of Agronomy, National Chung Hsing University

Wu, Hung-Pan
Institute of Plant & Microbial Biology, Academia Sinica

Editorial Assistants

Chen, Siang-Jiun
Commission of R&D Strategy on Agric. Sci. & Technol., Taiwan Agricultural Research Institute

Wu, Yi-Yan
Division of Technical Service, Taiwan Agricultural Research Institute

JOURNAL OF TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH

Vol. 62 No. 3 September 30, 2013

Published by Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture

Publisher	Junne-Jih Chen
Editor-in-Chief	Chwen-Ming Yang
Address	No.189, Zhongzheng Rd., Wufeng Dist., Taichung City 41362, Taiwan, ROC
Website	http://www.tari.gov.tw; E-mail: jtar@tari.gov.tw; Tel: +886-4-2331-7236
Submission	http://aspers.airiti.com/Aspers/webHome.aspx?jnliid=J0042
Press	Airiti Press Inc.
Address	18F., No.80, Sec.1, Chenggong Rd., Yonghe Dist., New Taipei City 23452, Taiwan, ROC
Tel	+886-2-2926-6006
E-mail	press@airiti.com
Price	NT$ 175 (per copy)
Distributor	1. GB Books / 1F., No.209, Songjiang Rd., Taipei City 10485, Taiwan, ROC GB Website: http://www.govbooks.com.tw; Tel: +886-2-2518-0207 2. Wunan Books / No.6, Zhongshan Rd., Taichung City 40042, Taiwan, ROC Tel: +886-4-2226-0330